

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE -
Systèmes intégrés en Biologie, Agronomie,
Géosciences, Hydrosciences et Environnement**

Et de l'unité de recherche : **CIRAD-UMR 15 CMAEE**

Spécialité : **Entomologie médicale et vétérinaire**

Présentée par **Soumaïla PAGABELEGUEM**

**Lutte contre les mouches tsé-tsé en
Afrique de l'Ouest : optimisation
de l'utilisation de la technique de
l'insecte stérile**

Soutenue le 15/12/2015 devant le jury composé de :

| | |
|--|-----------------------|
| Mr Jérôme DEPAQUIT, Professeur, Université Reims | Rapporteur, Président |
| Mr Reginald DE DEKEN, Professeur, IMT | Rapporteur |
| Mme Anne GEIGER, CR, IRD | Examineur |
| Mr Jérémie BOUYER, DR2, CIRAD | Directeur de thèse |

Invités :

| | |
|---|-----------------------|
| Mr Issa SIDIBE, CR, PATTEC Burkina Faso | Co-directeur de thèse |
| Mme Sophie RAVEL, CR, IRD | Encadreur |

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

- mes parents Adama W. PAGABELEGUEM et Aminata SANKARA. Merci pour tous les sacrifices consentis pour moi. C'est grâce à vous que je suis ce que je suis ;*
- à la mémoire des défunts Rasmané PAGABELEGUEM mon petit frère et mes grands-parents Salif R. PAGABELEGUEM et Mariam C. SABO. Que leurs âmes reposent en paix ;*
- aux familles PAGABELEGUEM, SABO et GANOU.*

Remerciements

Après 3 ans de travaux et de multiples collaborations, je tiens à adresser mes sincères remerciements :

Au Dr Jérémy Bouyer qui a accepté de diriger cette thèse et a mis à ma disposition les conditions nécessaires pour y arriver. Après m'avoir encadré pour ma formation d'Ingénieur du Développement Rural, option Elevage en 2010 ; pour ma formation de Master 2 en Entomologie médicale et vétérinaire, MIE (2012) et pour ma formation de Master 2 en Santé Animale Tropicale (2013), il n'a pas hésité à donner son accord pour être mon Directeur de thèse et à s'y investir. Je lui exprime du fond du cœur toute ma gratitude pour la confiance placée en moi, sa rigueur scientifique dans l'encadrement et son soutien sans faille durant toutes ces 6 années passées ensemble. Mes sincères remerciements à lui pour m'avoir fait aimer le métier de chercheur. J'ose croire que ceci n'est que le début d'une longue collaboration sans faille.

Au Dr Issa Sidibé, Coordonnateur national de la PATTEC Burkina Faso, pour avoir accepté de m'accueillir dans sa structure d'abord en tant que contractuel puis en tant que fonctionnaire. Rien n'aurait été possible sans la PATTEC Burkina Faso, dont il est la pierre angulaire. Ma gratitude à lui pour la confiance qu'il a témoigné à mon égard en acceptant de codiriger cette thèse. Malgré ses occupations multiples, il a toujours été disponible à toutes mes sollicitations et toujours déterminé à m'écouter et à me conseiller. Un grand merci à lui pour m'avoir autorisé à faire des mobilités dans d'autres institutions pour pouvoir mener mes expériences. Aussi, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines.

A travers le Dr Issa Sidibé, je dis merci au Ministère des Ressources Animales du Burkina Faso.

Au Dr Sophie Ravel qui n'a ménagé aucun effort pour m'accueillir au sein du CIRAD Baillarguet et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger mes expériences. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique et la détermination avec lesquelles elle m'a aidé à surmonter les difficultés. Enfin, je lui dis sincèrement merci pour les bonnes pratiques de laboratoire qu'elle m'a inculqué.

Au personnel de PATTEC Burkina Faso

Je me suis toujours senti en famille dans la PATTEC et je dis grandement merci à tout le personnel, en particulier Mamadou Ouédraogo, Zowindé Koudougou, Oumarou Serdebeogo, Ange I. Toé, Bibata Zouré, Fatou Son/Konaté, Aristide Poda, Sériba Dembélé, Domba Barro, Moussa Niampa, Salamata Compaoré, Ousmane Sougué, Emmanuel Sanou, Azara Konaté pour leur disponibilité. Je remercie tout le personnel d'appui. A tous je dis merci de vos soutiens et conseils et pour l'humour de tous les jours que nous avons partagé ensemble.

Un clin d'œil amical à Lassané Percoma et Pooda Sié Hermann pour leur appui et nos discussions passionnées, courage à vous pour la suite de vos thèses.

A l'ISRA/LNERV

Merci au LNERV dans lequel je suis resté 9 mois. Je remercie particulièrement les Drs Momar Talla Seck, Yaya Thiongane, El-Hadji Traoré et le secrétariat. Au service BEPP, je réitère mes remerciements aux Drs Assane Gueye Fall, Lamine Djiba, Moussa Fall, Mariam Sow/Diarra pour leur disponibilité. Le personnel de l'insectarium pour tous ces passionnants moments passés ensemble à l'insectarium et sur le terrain. En particulier, je remercie Saliou Niang, Idriss Sarr, Binetou Faye/Traoré ou "Mme Tra", Mireille Bassène, Abdou Mbaye.

Le pot d'au revoir "Ndogou" organisé gracieusement par le LNERV à la fin de mon séjour témoigne de la franche collaboration qu'il y a eu et ce geste reste inoubliable pour moi.

Au Dr Geoffrey Gimonneau qui a été toujours disponible à mes sollicitations, pour les corrections même dans l'urgence et pour ses encouragements.

A Ahmadou Dicko pour son aide dans les analyses de données notamment la partie modélisation de la survie des mouches en fonction des conditions climatiques, courage à toi pour la suite de ta thèse.

Au CIRAD-Campus Baillarguet

Merci à toute l'UMR117 IRD/CIRAD - INTERTRYP, dans laquelle je suis resté 9 mois. Je suis profondément reconnaissant aux Drs Philippe Solano, David Berthier, Bruno Bucheton, Sophie Thévenon, Thierry De Meeûs, Veerle Lejon, Philippe Truc. Merci à Isabelle Chantal, Alicia Bert et Florence Escoms pour leur disponibilité. Je remercie particulièrement Bernadette Tchicaya et Christophe Estienne pour leur disponibilité et les merveilleux moments passés ensemble à l'insectarium.

Merci à toute l'UMR 15 CIRAD/INRA - CMAEE en particulier les Drs Thierry Lefrançois, Renaud Lancelot, Thomas Balenghien, Claire Garros, Frédéric Stachurski et les techniciens Xavier Allene et Ignace Rakotoarivony. Je remercie Dr Karine Huber pour m'avoir aidé dans l'étalonnage des cellules climatiques et au Dr Laurence Vial qui m'a prêté une de ses étuves climatiques pour une partie de mes expériences. Merci à Hammami Pachka pour sa courtoisie et son aide dans la maîtrise du Logiciel "Inkscape", courage à toi pour la suite de ta thèse.

J'ai apprécié la bonne collaboration qui existe entre ces deux unités et cela m'a rendu énormément service.

A l'AIEA

Pour leur soutien sans faille dans l'acquisition des pupes pour nos différentes expériences menées au Sénégal et à Montpellier. Mes remerciements vont particulièrement à l'endroit des Drs Marc J.B. Vreysen, Andrew Parker, Gratian N. Mutika et la technicienne Carmen Marin pour leur disponibilité et les corrections apportées aux différents articles.

A travers l'AIEA, je remercie le Slovak Academy of Sciences (SAS) en particulier Dr Peter Takac pour sa disponibilité. Un grand merci au personnel des insectariums de l'AIEA et SAS pour leur bonne collaboration dans l'envoi des pupes.

Au CIRDES

Merci à tout le personnel du CIRDES en particulier les Drs Valentine Yapi/Gnaoré, Zakaria Bengaly, Charles Dayo, Mamadou Sangaré, Aboubacar Toguyéni, Augustin Bancé, Augustin Kanwé.

Je présente un grand merci au Dr Jean-Baptiste Rayaissé pour avoir participé aux comités de suivi de thèse et pour la qualité des échanges scientifiques qui m'ont été très précieux.

Un grand merci au personnel de l'insectarium du CIRDES en particulier Céné Bila, Guy Sanou, Pacôme S. Kioyé, Simon P. Kaboré, Denis Wedraogo, Yacouba Sirima pour les remarques et conseils techniques mais aussi pour leur bonne collaboration dans l'envoi des pupes à Dakar.

Mes enfin à mes aînés du CIRDES, les Drs Bienvenu Somda, Hamidou Ilboudo, Jacques Kaboré, Ernest Salou, Emilie Dama dont certains ont pu apporter des corrections à ce document.

A ma dulcinée Sara Ganou qui a su garder patience et a accepté de supporter notre amour malgré la distance qui nous sépare parfois. Aux garçons Safouane G. Pagabeleguem et Rayan K. Pagabeleguem, sachez que vous êtes la source de ma motivation quotidienne. Merci à vous tous pour la tendresse et le courage que vous avez toujours su me donner.

Aux membres du jury : les Professeurs Reginald De Deken et Jérôme Depaquit qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs, Dr Anne Geiger qui m'honore d'examiner ce travail et sa participation aux comités de suivi de thèse.

Ce travail a été financé par la PATTEC Burkina Faso, le Projet glossine à l'ISRA/LNERV, l'Ambassade de France à Ouagadougou, l'AIEA, le CIRAD (projet IVEMA) et l'IFS - Syngenta foundation à qui je dis merci.

Tables des matières

| | |
|--|----|
| Dédicaces | 1 |
| Remerciements | 2 |
| Tables des matières | 4 |
| Résumé | 6 |
| Abstract | 7 |
| Sigles et abréviations..... | 9 |
| Liste des figures | 11 |
| Liste des tableaux | 12 |
| Introduction générale | 13 |
| Chapitre I : Synthèse bibliographique : trypanosomoses - glossines - lutte anti-vectorielle.. | 16 |
| 1.1. Généralités sur les trypanosomoses africaines | 16 |
| 1.1.1. Trypanosomoses animales..... | 16 |
| 1.1.2. Trypanosomoses humaines | 18 |
| 1.2. Généralités sur les mouches tsé-tsé | 19 |
| 1.2.1 Ecologie des mouches tsé-tsé | 19 |
| 1.2.2. Elevage de mouches tsé-tsé..... | 23 |
| 1.2.2.1. Intérêts de l'élevage des mouches | 23 |
| 1.2.2.2. Colonisation | 23 |
| 1.2.2.3. Conditions environnementales de l'insectarium | 25 |
| 1.2.2.4. Alimentation de la colonie | 26 |
| 1.2.3. Lutte anti-vectorielle | 27 |
| 1.2.3.1. Stratégies de lutte | 27 |
| 1.2.3.2. Prérequis pour la mise en place d'un programme de lutte intégrée | 27 |
| 1.2.3.3. Lutte chimique..... | 29 |
| 1.2.3.4. Technique de l'insecte stérile | 32 |
| 1.2.3.4.1. Historique et définition des concepts de la TIS..... | 32 |
| 1.2.3.4.2. Prérequis pour réussir un programme utilisant la TIS..... | 34 |
| 1.2.3.4.3. Avantages et inconvénients de la technique..... | 35 |
| 1.2.3.5. Etat des lieux des campagnes de lutte entreprises dans le cadre de la PATTEC | 36 |
| 1.2.3.6. Perspectives d'utilisation de la lutte génétique | 39 |
| Chapitre II : Transport à longue distance de pupes matures de glossines | 41 |
| 2.1. Etude..... | 41 |

| | |
|--|------------|
| 2.2. Conclusion..... | 55 |
| Chapitre III : Contrôle qualité des mâles stériles de glossines | 56 |
| 3.1. Etude..... | 56 |
| 3.2. Conclusion..... | 71 |
| Chapitre IV : Discrimination entre mâles stériles et sauvages par des outils moléculaires ... | 72 |
| 4.1. Etude..... | 72 |
| 4.2. Conclusion..... | 74 |
| Chapitre V : Trait de vie de glossines dans différentes conditions climatiques | 96 |
| 5.1. Etude..... | 96 |
| 5.2. Conclusion..... | 122 |
| Chapitre VI : Discussion générale | 123 |
| 6.1. Transport des pupes matures irradiées | 123 |
| 6.2. Qualité des mâles stériles | 124 |
| 6.3. Discrimination mâles stériles/sauvages..... | 126 |
| 6.4. Trait de vie de glossines à différentes conditions climatiques | 127 |
| Conclusions et perspectives | 129 |
| Références bibliographiques | 134 |

Résumé

En Afrique sub-saharienne, près de 10 millions de km² de terres, les plus fertiles en productions fourragères et agricoles, sont infestées de mouches tsé-tsé limitant ainsi les initiatives de développement d'une agriculture durable. Les tsé-tsé transmettent des trypanosomes qui sont responsables des trypanosomoses animales et humaines africaines. En 2000, les Chefs d'Etats et de Gouvernements africains ont décidé de redoubler d'efforts pour lutter contre les mouches tsé-tsé et les trypanosomoses en créant la Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC). Dans ce contexte, le gouvernement sénégalais a initié un programme d'éradication des glossines dans la zone des Niayes en utilisant une souche de *Glossina palpalis gambiensis* originaire du Burkina Faso. La présente thèse visait à optimiser l'utilisation de la technique de l'insecte stérile (TIS) en Afrique de l'Ouest pour lutter contre les glossines.

Un dispositif de transport sur de longues distances de pupes matures a été développé et validé à partir de pupes mâles de *G. p. gambiensis* produites et irradiées à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso et à Bratislava, Slovaquie (irradiation faite à Seibersdorf, Autriche) et transportées par voie aérienne jusqu'à Dakar, Sénégal. Le dispositif constitué d'une boîte isotherme et des packs S8 a permis de maintenir les pupes à une température de $10 \pm 3^{\circ}\text{C}$ et de les transporter pendant 2-3 jours jusqu'au centre d'émergence de l'ISRA, pour produire des mâles stériles utilisables pour la technique de l'insecte stérile.

Un contrôle qualité a été réalisé sur un échantillon de 50 pupes prélevé dans chaque lot de pupes (minimum 2 lots par envoi) pour déterminer l'aptitude d'envol des mâles stériles et leur survie sous stress (à jeun). Le reste des pupes utilisé pour les lâchers sur le terrain a été considéré comme témoin. Le protocole qualité décrit permettra un suivi précis de la qualité des mâles stériles utilisés dans les programmes opérationnels d'éradication dans le cadre de la PATTEC.

Un outil moléculaire de discrimination de mâles stériles lâchés et sauvages a également été développé à partir du gène mitochondrial COI (cytochrome oxydase) et a montré que les séquences COI des mouches lâchées (produites en insectarium) sont 100% identiques entre elles et différentes de celles des mouches sauvages.

Par ailleurs, afin de déterminer les conditions optimales d'élevage de souches de *G. p. gambiensis* et de déterminer la souche qui sera la plus adaptée à tel ou tel environnement ou pays dans le cadre d'une lutte avec une composante lâcher de mâles stériles, les traits de vie (survie et fécondité) de trois souches de *G. p. gambiensis* (souches originaires du Burkina Faso

(BKF), Sénégal (SEN) et souche introgressée (SENbkf) ont été évalués dans différentes conditions de températures et d'humidités relatives. La température optimale d'élevage en masse a été de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $24,6 \pm 1^\circ\text{C}$ et $23,9 \pm 1^\circ\text{C}$ pour BKF, SENbkf et SEN respectivement. La variation de l'humidité relative (entre 40 et 75%) a eu très peu d'influence sur la survie et la fécondité. La souche BKF a mieux résisté à de fortes températures que les souches SEN et SENbkf, mais la température limite de survie a été de 32°C pour les trois souches.

Mots clés : Lutte intégrée, Technique de l'insecte stérile, Eradication, Transport de pupes, Contrôle qualité, Seuils critiques de survie, Fécondité, *Glossina palpalis gambiensis*

Abstract

In sub-Saharan Africa, nearly 10 million km² of land, mostly fertile and suitable for animal husbandry and agricultural production, are infested with tsetse flies limiting the development of more sustainable agriculture. Tsetse flies transmit trypanosomes that cause human and African animal trypanosomosis, a debilitating disease of humans (sleeping sickness) and livestock (nagana). In 2000, the African Heads of State and Government decided to increase efforts to address the tsetse and trypanosomosis problem on the African continent and created the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC). In this context, the Government of Senegal initiated a program that aimed at eradicating a population of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes area. The program was based on area-wide integrated pest management (AW-IPM) approaches, and combined several control tactics, including the sterile insect technique (SIT). The sterile flies used for the SIT component were derived from a colony that has been maintained for 4 decades in Burkina Faso. The objective of this thesis was to optimize the use of the SIT in West Africa and as such, make the management of tsetse populations more effective.

A protocol to transport mature male pupae over long distances was developed and validated, i.e. male *G. p. gambiensis* pupae were produced in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso and in Bratislava, Slovakia, and after irradiation transported by air to Dakar, Senegal. The pupae were placed in insulated transport boxes that contained phase change S8 packs that maintained an average temperature of $10 \pm 3^\circ\text{C}$ in the transport box during the 2-3 day-transport from the institute of origin to a pupal emergence and dispersal center in Dakar.

A quality control protocol was developed to assess the biological quality of the emerged male flies after long distance transport. A sample of 50 pupae was taken from each batch (at least 2 batches per shipment) to determine the flight ability of sterile males and their survival under stress conditions (without feeding). The remaining emerged adults were considered as the control group and were released in the target area of the program. The described protocol for quality control will allow accurate monitoring of the quality of sterile males used in operational eradication programs organized in the context of PATTEC.

A molecular method to distinguish between sterile and wild males was also developed using the mitochondrial COI (cytochrome oxidase) gene. We showed that COI sequences of mass-reared and released flies were 100% identical and significantly different from those of wild flies.

Furthermore, the life history (survival and fecundity) of three *G. p. gambiensis* strains (originating from Burkina Faso (BKF), Senegal (SEN), and an introgressed strain (SENbkf)) were investigated at different temperatures and relative humidity conditions to assess optimal rearing conditions of these strains and to identify the strain that would be best adapted to a particular environment or country in the context of a control program with an SIT component,. The optimal temperature for the mass-rearing was $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $24.6 \pm 1^\circ\text{C}$ and $23.9 \pm 1^\circ\text{C}$ for the BKF, SENbkf and SEN strain, respectively. The relative humidity ranging from 40 to 75% had very little influence on the flies' survival and fecundity. The BKF strain resisted better higher temperatures than the SENbkf and SEN strains but the temperature limit for survival was around 32°C for all three strains.

Keywords: Area-wide integrated pest management, sterile insect technique, eradication, transport of pupae, quality control, survival critical thresholds, fecundity, *Glossina palpalis gambiensis*

Sigles et abréviations

AICc : corrected Akaike Information Criterion

AIEA ou IAEA : Agence International de l'Energie Atomique ou International Atomic Energy Agency

ARN : Acide Ribonucléique

AW-IPM : Area-wide Integrated Pest Management

BEPP : Service Bio-Ecologies et de Pathologies Parasitaires

CI-J-2195/CULR : Amorces spécifiques pour l'amplification de l'ADN de glossines

CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

CIRDES : Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zones Subhumides

COI : Cytochrome Oxidase I

CRTA : Centre de Recherche sur la Trypanosomiase Animale

CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

EPS : Expanded Polystyrene

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

G. f. fuscipes : *Glossina fuscipes fuscipes*

G. p. gambiensis : *Glossina palpalis gambiensis*

HR : Humidité relative

ICSA : Institut Carnot Santé Animale

IFS: International Foundation for Science

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IPCL : Insect Pest Control Laboratory

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricoles

ITC : Insecticide-Treated Cattle

ITT : Insecticide-Treated Traps/Targets

LNERV : Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires

MgCl : Chlorure de Magnésium

MIE : Master International d'Entomologie médicale et vétérinaire,

OMS ou WHO : Organisation Mondiale de la Santé ou World Health Organization

ORSTOM : Office de la recherche scientifique et technique outre-mer

PATTEC : Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign

PCM : Phase Change Material

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGRP-LB : Peptidoglycan-recognition protein LB

PUI : Peaceful Uses Initiative

QC : Pupae of the quality control test

RF : Pupae destined for release in the operational programme

SAS : Slovak Academy of Sciences

SAT : Sequential Aerosol Technique ou pulvérisation séquentielle d'aérosol

SCAC : Service de Coopération et d'Action Culturelle

SGHV : Salivary Gland Hypertrophy Virus ou Virus de l'hypertrophie de la glande salivaire

Souche BKF : Souche originaire du Burkina Faso

Souche SEN : Souche originaire du Sénégal

Souche SENbkf : souche introgressée (SEN x BKF)

SSPC : Self-Stocking of Production Cage

TAA ou **AAT** : Trypanosomose Animale Africaine ou African Animal Trypanosomosis

THA ou **HAT** : Trypanosomose Humaine Africaine ou Human African Trypanosomosis

TII : Technique de l'Insecte Incompatible

TIS ou **SIT** : Technique de l'Insecte Stérile ou Sterile Insect Technique

TPU : Tsetse Production Unit

UMR-CMAEE : Unité Mixte de Recherche - Contrôle des Maladies Animales Exotiques

UMR-INTERTRYP : Unité Mixte de Recherche - Interactions hôtes-vecteurs-parasites-environnement dans les maladies tropicales négligées dues aux trypanosomatides

Unités de mesures : km²: kilomètre carré ; m : mètre ; Mg : microgramme ; cm : centimètre ; M: micromolaire ; mM: millimolaire ; µl: microlitre ; °C : degré celcius ; Gy (Gray) : unité de mesure de l'énergie absorbée par un milieu homogène d'une masse lorsqu'il est exposé à un rayonnement ionisant

USA : United States of America

UV : Ultra-Violet

Liste des figures

Chapitre 1 :

| | |
|---|----|
| Figure 1. Carte de répartition de glossines..... | 20 |
| Figure 2. Evolution de la limite nord des glossines au Burkina Faso avant le temps..... | 21 |
| Figure 3. Cadre de décision pour le contrôle des mouches tsé-tsé et des trypanosomoses animales africaines..... | 29 |

Chapitre 2 :

Research article

| | |
|---|----|
| Figure 1. Temperature and relative humidity recorded inside the insulated transport box with a data logger during a pupal shipment from Bobo-Dioulasso to Dakar (10-11/02/2012)..... | 46 |
| Figure 2. (top) The number of sterile males available for release, (bottom) the average temperature (orange line) and relative humidity (green line) during the transport from Bobo-Dioulasso to Dakar..... | 46 |
| Figure 3. Correlation between the temperature and relative humidity during transport and entomological parameters..... | 48 |

Additional file

| | |
|--|----|
| Figure 1. Packing of mature pupae in a carton..... | 53 |
| Figure 2. Packing of the cartons holding the pupae in the transport container..... | 54 |
| Figure 3. Irradiation conditions used to maintain the cold chain during irradiation..... | 55 |

Chapitre 3:

| | |
|---|----|
| Fig 1. Illustration of the set up of quality assessment of sterile male flies during the tsetse eradication project in Senegal..... | 62 |
| Fig 2. Relationship between the fitted and observed values of the quality assessment parameters..... | 65 |
| Fig 3. Survival curves of sterile males that were kept without food and had to survive on their fat reserves..... | 65 |

Chapitre 4:

| | |
|--|----|
| Figure 1. Pictures of (upper left) a UV camera that is used to visualize the fluorescent dye in the head capsules of sterile males, (upper middle and right) red and green fluorescent dye in the head capsule of <i>Glossina palpalis gambiensis</i> , (lower left and middle) doubtful marking with only a few powder particles visible, (lower right) head of a wild fly..... | 95 |
|--|----|

Chapitre 5:

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Performance parameters of the various <i>Glossina palpalis gambiensis</i> strains (BKF, SEN and SENbkf) in the insectaries of origin..... | 109 |
| Figure 2. Survival curves of flies by treatment, strain and sex..... | 110 |
| Figure 3. Correlation between daily mortality and average temperature for male and female flies of the BKF, SEN, and SENbkf strains..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| Figure 4. Mean survival rate of the BKF, SEN, and SENbkf strains plotted against the maximum temperature..... | 112 |
|---|-----|

Liste des tableaux

Chapitre 1 :

| | |
|---|----|
| Tableau I : Conditions environnementales à l'insectarium (adapté de (Opiyo et al. 2006)). | 25 |
|---|----|

Chapitre 2 :

| | |
|---|----|
| Table 1. Effect of batch on flies emergences parameters (average \pm sd). | 47 |
|---|----|

Chapitre 3:

| | |
|--|----|
| Table 1. Average values \pm sd (%) of different parameters from the QC and RF presented by origin and batch. | 64 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Table 2. Percentage (\pm sd) of flies escaping the flight cylinder and their median survival by origin and year. | 66 |
|---|----|

Chapitre 4:

| | |
|---|----|
| Table 1. Characteristics of analyzed samples of <i>G. p. gambiensis</i> from various countries and sites. | 81 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Table 2. Discrimination between sterile flies from the CIRDES insectary and wild flies from Senegal and Burkina Faso based on a comparison of the COI sequences. | 84 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Table 3. Results from visual identification of sterile and wild flies using a UV camera and the molecular method that is based on the sequence of the COI gene. | 85 |
|---|----|

Chapitre 5:

| | |
|--|-----|
| Table 1. Theoretical temperature and relative humidity and average (\pm sd) environmental conditions as experienced by the flies and recorded with the Kimo [®] loggers. | 107 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Table 2. Distribution of flies used for experiments per strain, sex and treatment. | 107 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Table 3. Median survival (days) per sex, strain and treatment. | 111 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Table 4. Productivity rate and emergence rate of pupae according to various experimental conditions. | 113 |
|--|-----|

Introduction générale

Les terres les plus fertiles de l'Afrique subsaharienne, estimées à plus de 10 millions de km², abritent des mouches tsé-tsé ou glossines, du genre *Glossina* (Pollock 1982a; Leak 1999). Ces glossines transmettent des parasites du genre *Trypanosoma* responsables des trypanosomoses animales (TAA) et humaines africaines (THA) (Itard et al. 2003a). La corrélation remarquable du chevauchement entre les 38 pays infestés par les glossines et les 34 pays pauvres très endettés de l'Afrique laisse penser que le sous-développement des pays africains est en partie tributaire à la mouche tsé-tsé (Feldmann et al. 2005). Elle limite ainsi toutes les initiatives de développement d'une agriculture durable (Hursey and Slingenbergh 1995; Itard et al. 2003a). En effet, la perte globale annuelle en production du cheptel et en production céréalière est évaluée à plus de 4750 millions de dollars (Hursey and Slingenbergh 1995; Budd 1999). Par exemple, une analyse comparative entre zones infestée et non infestée par les glossines sur la base de la production du lait et de viande dans la zone des Niayes au Sénégal a prouvé qu'éradiquer les glossines rapporterait annuellement environ 2,8 millions d'euros après une période de 20 ans (Bouyer et al. 2014). Les approches utilisées depuis des décennies pour contrôler les trypanosomoses, basées sur la chimiothérapie et/ou la lutte anti-vectorielle par l'utilisation d'insecticides semblent insuffisantes (De La Rocque and Cuisance 2005). En effet, à l'exception du cas à l'ouest de la Zambie avec *G. morsitans centralis* (espèce savanicole) (Knols et al. 1993), aucune éradication n'a été atteinte à partir de ces approches et pire une résistance a été développée contre les trypanocides disponibles et aucune nouvelle molécule ne se profile à l'horizon (Geerts et al. 2001). La stratégie d'une lutte intégrée utilisant les techniques chimiques en amont de la technique de l'insecte stérile (TIS) a été appliquée avec succès à Zanzibar contre *Glossina austeni* (Vreysen et al. 2000), au Burkina Faso contre *G. tachinoides*, *G. palpalis gambiensis* et *G. morsitans submorsitans* (Cuisance et al. 1984; Politzar and Cuisance 1984a) et au Nigéria contre *G. palpalis palpalis* (Takken et al., 1986). Toutes ces campagnes ont démontré l'efficacité de la TIS contre les glossines d'espèces riveraines et savaniques même si les deux dernières régions ont connu une ré-invasion par manque d'isolement des zones assainies. Eu égard à ces résultats motivants et aux contraintes multiformes liées à la présence des glossines, les Chefs d'Etats et de Gouvernements africains ont pris l'initiative en 2000 d'éradiquer les mouches tsé-tsé du continent afin d'assurer une sécurité alimentaire et nutritionnelle (Kabayo 2002). Ainsi, sous les auspices de l'Union Africaine, la Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC) a été créée avec la mise en place de six (6) projets pilotes (Burkina Faso, Ghana, Mali, Kenya,

Ouganda et Ethiopie) dont la stratégie de lutte était l'approche intégrée (Kabayo 2002). En raison d'une part d'un arrêt trop précoce des financements et d'autre part, du manque de recherche opérationnelle pendant la phase de faisabilité et d'une absence de gestion adaptative, les résultats de ces projets restent aujourd'hui mitigés alors que la plupart de ces projets (Burkina Faso, Mali, Ouganda, Kenya) avaient prévu l'utilisation de la TIS pour atteindre l'éradication.

De nos jours, l'application de la TIS contre les glossines possède des atouts comme l'existence de deux insectariums en Afrique (l'un au Burkina Faso en Afrique de l'Ouest et l'autre en Ethiopie en Afrique de l'Est) ayant chacun la capacité de produire 1 000 000 de glossines mâles stériles par semaine ; l'existence et la maîtrise des techniques de suppression à moindre impact environnemental (réduction de 98% des densités en moins de six mois) (Adam et al. 2013; Sow 2013a) et les techniques d'évitement des ré-invasions (Vreysen et al. 2013b). Cependant, l'aspect technique le plus important pour la réussite de la TIS est la qualité biologique des mouches stériles à lâcher (Krafsur and Hightower 1979; Vreysen 2005). Pour *G. p. gambiensis*, même si il y a compatibilité entre différentes souches de différents pays (Mutika et al. 2013) et que de nouvelles souches ont été créées pour sécuriser les campagnes futures (Mutika et al. 2013), le pari de la qualité biologique est loin d'être gagné. En effet, produire en masse des glossines en insectarium nécessite des conditions optimales d'élevage qui sont spécifiques à l'espèce voire à la souche (Opiyo et al. 2006). De plus, les besoins en mâles stériles pour les campagnes futures nécessiteront un transport de pupes stériles des pays producteurs vers ceux des utilisateurs. Or, transporter des pupes matures stériles sur une longue distance pour mener une campagne d'éradication est une nouvelle pratique avec les glossines, et nécessite une étude opérationnelle pour la maîtrise des différents paramètres. C'est ce qui justifie la présente thèse qui s'inscrit dans le cadre de la campagne d'éradication de *G. p. gambiensis* en cours dans la zone des Niayes au Sénégal à partir d'une souche originaire du Burkina Faso en élevage dans les insectariums du Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso et du Slovak Academy of Sciences (SAS), Bratislava, Slovaquie. L'objectif général de la thèse est d'optimiser l'utilisation de la TIS dans la lutte contre les mouches tsé-tsé en Afrique de l'Ouest et pour l'atteindre, les quatre objectifs spécifiques suivants ont été définis :

- 1) évaluer l'efficacité d'un dispositif de transport de pupes matures irradiées et son impact sur le rendement en mâles stériles utilisables pour la composante TIS ;
- 2) développer et valider un protocole qualité des mâles stériles ;

- 3) développer et valider un outil moléculaire de discrimination des mâles stériles et sauvages ;
- 4) évaluer le trait de vie (survie et fécondité) de trois souches de *G. p. gambiensis* dans différentes conditions de température et d'humidité relative.

Avant la présentation des différents sujets qui ont été abordés dans ce travail, une revue bibliographique sera faite sur les trypanosomoses humaines et animales africaines, l'écologie, la répartition et la biologie des glossines ainsi que les différentes méthodes de lutte (chapitre 1).

L'étude en elle-même est subdivisée en 4 chapitres dont 3 portent sur des protocoles développés pour optimiser l'utilisation de la TIS dans la lutte contre les glossines et le dernier sur les traits de vie de glossines. Le premier sujet (chapitre 2) porte sur l'efficacité d'un dispositif de transport à longue distance de pupes mâles irradiées de glossines et son impact sur le rendement en mâles stériles utilisables pour les opérations de lâchers. La deuxième activité (chapitre 3) quant à elle fait cas de la mise au point d'un protocole d'évaluation de la qualité des mâles stériles utilisés. Le chapitre 4 porte sur le développement d'un outil moléculaire de discrimination des mâles stériles et sauvages. Le chapitre 5 porte sur l'étude des traits de vie de trois souches de *G. p. gambiensis* à différentes conditions de température et d'humidité relative. La dernière partie du document est consacrée à une discussion générale couvrant l'ensemble des travaux (chapitre 6).

Chapitre I : Synthèse bibliographique : trypanosomoses - glossines - lutte anti-vectorielle

1.1. Généralités sur les trypanosomoses africaines

L'appellation trypanosomose africaine vient du fait que la maladie transmise principalement par la mouche tsé-tsé se rencontre uniquement sur le continent africain. La maladie est causée par des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma* qui sont des parasites obligatoires des vertébrés. Ils vivent dans le plasma sanguin, la lymphe et divers tissus de leurs hôtes (Itard 1981). Chez l'homme, la maladie est appelée trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil et chez l'animal, trypanosomose animale africaine (TAA) ou nagana. Il existe une spécificité des trypanosomes responsables de chaque maladie. La compréhension de l'épidémiologie de ces maladies nécessite une bonne analyse de la relation entre les trois acteurs, à savoir : le vecteur, le parasite et l'hôte. La description plus fine du vecteur sera faite plus bas.

1.1.1. Trypanosomoses animales

La TAA est causée par une variété d'espèces de *Trypanosoma* dont les plus importantes en terme de pertes économiques pour le bétail sont *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*, *T. (Duttonella) vivax* et *T. (Trypanozoon) brucei sensu lato* (Seck et al. 2010; Adam et al. 2012; Pagabeleguem et al. 2012b; Sow et al. 2013b; Shifaw et al. 2015). La pathogénicité des trypanosomes dépend de l'espèce ou de la souche parasitaire et de l'espèce ou de la race de l'hôte vertébré, ainsi que de son état sanitaire, nutritionnel, physiologique et de sa trypanotolérance (Cuisance et al. 2003). Chez les ruminants domestiques, *T. congolense* est le plus pathogène et est responsable des infections aiguës mais possède une répartition moins large que *T. vivax* qui est aussi transmis mécaniquement par les Tabanidés et les Stomoxes (Desquesnes and Dia 2003). *T. congolense* et *T. brucei* ont une répartition qui se limite à celle des glossines bien que capables d'être transmis par les vecteurs mécaniques (Mihok et al. 1995; Itard 2000; Itard and Cuisance 2003b; Desquesnes et al. 2009). A l'exception de *T. evansi* qui est exclusivement transmis mécaniquement par les tsé-tsé et les vecteurs mécaniques (Luckins 1988), et *T. equiperdum*, tous les trypanosomes pathogènes à l'animal sont transmis cycliquement à travers la pique de glossine, vecteur biologique.

Les TAA apparaissent en toute saison mais leur évolution dépend de la pression vectorielle. En effet, chez les glossines riveraines (sous-genre *Nemorhina*), le risque de transmission se limite

au voisinage des cours d'eau mais reste permanent tout au long de l'année. Par contre, chez les glossines de savane (groupe *morsitans*), la distribution est très dépendante de la saison. Elles représentent un risque élevé en saison pluvieuse, mais diffus dans l'espace.

La gravité de la maladie est plus importante chez les bovins de race trypanosensible (*Bos indicus* : zébus) contrairement aux races trypanotolérantes (*Bos taurus* : N'Dama et Baoulés) grâce à une réponse antigénique forte et précoce vis-à-vis de protéines majeures de la pathogénicité de ces dernières (Authié et al. 1993; Authié et al. 2001). Chez les animaux exotiques provenant des pays du Nord, le taux de létalité est très élevé (Bengaly 2003).

En fonction de la situation éco-épidémiologique, quatre types de TAA peuvent être définis (Van den Bossche et al. 2003; Pagabeleguem et al. 2012b; Bouyer et al. 2013a) :

- la TAA selvatique : ce cycle se rencontre généralement dans les zones conservées. Le parasite transmis par les tsé-tsé circule entre les espèces trypanotolérantes de la faune sauvage. Dans le cycle selvatique, malgré la forte virulence du parasite, l'adaptation hôte sauvage - parasite crée une situation d'équilibre. La morbidité et la mortalité sont très faibles. Les bovins peuvent parfois rentrer dans le système lors de la pâture dans ces zones et être infectés avec ce parasite virulent ;

- la TAA d'interface : ce cycle s'observe au niveau de l'interface entre zones protégées et pastorales. En général, la diversité et la densité des tsé-tsé sont importantes et les souches virulentes sont transmises des animaux sauvages aux bovins. La faune sauvage porteuse saine a des prévalences généralement élevées constituant ainsi un réservoir important de parasites pour le bétail. Les parasites transmis au niveau de ces interfaces sont généralement plus pathogènes pour le bétail que ceux transmis uniquement chez ce dernier (section suivante) (Van den Bossche et al. 2003) ;

- la TAA endémique : dans ce cycle, les glossines s'alimentent principalement sur les animaux domestiques. La virulence du parasite est réduite par sa circulation entre bovins. La densité et la diversité tendent à diminuer du fait de la pression humaine sur le paysage ;

- la TAA mécanique : elle se rencontre majoritairement dans les zones indemnes de glossines et *T. vivax* en est responsable. Les animaux transhumant dans les zones à glossines importent les trypanosomes et la transmission des animaux infectés aux sains est assurée par les vecteurs mécaniques. Un autre type d'importation du parasite peut être observé dans le système sédentaire où *T. vivax* est bien établi en absence totale de glossines. C'est le cas dans certains pays comme l'Ethiopie où les nombreux mouvements des bovins pourraient permettre l'importation du trypanosome (Bouyer et al. 2013a). L'implication possible de *T. congolense*

dans la TAA mécanique en zone indemne de glossines n'est pas à écarter et mérite d'être étudiée (Desquesnes et al. 2009).

1.1.2. Trypanosomoses humaines

La THA est causée par deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* transmise par les mouches tsé-tsé. Plus de 98% des infections se rencontrent en Afrique de l'Ouest et du Centre et sont dues à *T. b. gambiense*, tandis que *T. b. rhodesiense* qui représente un pourcentage limité des cas se localise en Afrique de l'Est et du Sud-est (Simarro et al. 2010; Kennedy 2013; WHO 2015). La forme THA *rhodesiense* est aiguë et fatale tandis que celle *gambiense* est généralement chronique et débilitante. Les deux formes sont fatales en absence de traitement ou en cas de traitement inadéquat bien que des cas de porteurs asymptomatiques aient été reportés (Jamonneau et al. 2012). Du fait de la toxicité des molécules utilisées, le traitement est basé sur le dépistage actif au moyen d'outils diagnostiques appropriés suivi de l'administration des produits curatifs. Le produit utilisé est fonction du stade et de la forme de la maladie (Kennedy 2008; Kennedy 2013). L'identification et le typage des espèces des parasites de la THA se fait à l'aide de la PCR (disponibilité de couples d'amorces spécifiques) et les microsatellites qui sont plus faciles et plus polymorphes (Kaboré et al. 2013; Koffi et al. 2015). Les isoenzymes sont aujourd'hui rarement utilisés car ils sont trop monomorphes pour étudier *T. b. gambiense* type 1 (trypanosome responsable de la THA) bien qu'ils soient un bon outil pour discriminer *T. b. gambiense* type 2 (non pathogène à l'homme) (Kaboré et al. 2013; Koffi et al. 2015).

En 1998, l'OMS estimait le nombre de cas à 300 000 (WHO 1998a) alors qu'en 2006, les estimations étaient entre 50 000 - 70 000 cas (WHO 2006) et en 2009, le nombre de nouveaux cas reportés était de 10 000 (Simarro et al. 2011). Sur les 10 000 cas de 2009, 73% provenaient de la République Démocratique du Congo et 11% de la République Centrafricaine (Simarro et al. 2011). La prévalence de la THA a substantiellement diminué ces dix dernières années bien qu'un nombre inconnu de cas reste non reporté ou diagnostiqué pour des raisons de moyens logistiques mais aussi des difficultés d'accès à certaines zones rurales, sans oublier les conflits dans plusieurs pays concernés (Odiit et al. 2005; Mumba et al. 2011). La réduction importante des cas de THA au cours de la dernière décennie est attribuable aux efforts majeurs consentis par l'OMS, ses partenaires et les gouvernements dans le dépistage et le traitement des malades et le contrôle du vecteur. L'objectif actuel de l'OMS est l'élimination de la THA à l'horizon 2020 (Simarro et al. 2010). Cela nécessite un soutien institutionnel et un financement adéquat

avec la participation active des structures de santé publique, des communautés et surtout une forte collaboration entre acteurs de la santé humaine et animale.

1.2. Généralités sur les mouches tsé-tsé

1.2.1 Ecologie des mouches tsé-tsé

En fonction des particularités bioécologiques et morphologiques, le genre *Glossina* se subdivise en trois groupes composés de 31 espèces et sous-espèces : le groupe *palpalis* qui comprend 9 espèces et sous-espèces dont *G. p. gambiensis*, sujet de l'étude, le groupe *morsitans*, constitué de 7 espèces et sous-espèces et le groupe *fusca* composé de 15 espèces et sous-espèces. Sur le plan épidémiologique, le groupe *fusca* est moins important car son rôle vecteur se limite en grande partie à la transmission de trypanosomes aux animaux sauvages, alors que les groupes *palpalis* et *morsitans* transmettent des trypanosomes pathogènes qui provoquent la THA et la TAA (Itard 2000).

La niche écologique des glossines est déterminée par le climat, la végétation, le sol, la vie animale et l'activité humaine (Pollock 1982b). Les éléments les plus importants du climat sont la température et l'humidité relative. Les glossines vivent bien à une température comprise entre 24-26°C qui correspond aux conditions climatiques optimales. Des températures élevées abrègent la durée de production de la première larve, la période interlarvaire, la durée de pupaison, la durée de vie de l'adulte et la durée pendant laquelle l'adulte peut vivre sans repas de sang. A l'opposé, les basses températures exercent l'effet contraire dans chaque cas (Pollock 1982b; Childs 2011). Au-delà de 32°C les pupes tout comme les adultes souffrent. Il en est de même pour des températures inférieures à 17°C. Par exemple, une température en dessous de 10°C bloque les émergences des pupes (Birkenmeyer and Dame 1975; Pollock 1982b; Mutika et al. 2014).

La pluviosité influence le degré hygrométrique et le maintien de la végétation. Les espèces des groupes *palpalis* et *fusca* ont besoin d'une forte humidité relative (optimale 65 à 85%) et sont inféodées aux forêts galeries et aux grandes forêts (Buxton 1955; Pollock 1982b). Celles du groupe *morsitans* sont plus xérophiles (optimum de 50 à 60% humidité relative (HR)) et se dispersent largement pendant la saison pluvieuse dans les savanes boisées et en saison sèche dans les microclimats les plus favorables des végétations bordant les cours d'eau (Buxton 1955; Pollock 1982b). L'humidité du sol joue un rôle capital dans la survie des pupes. La pluviométrie et l'activité humaine conditionnent la végétation : soit en la dégradant ou par plantation, créant

des microclimats favorables pour les glossines. C'est le cas dans la zone des Niayes au Sénégal où les plus fortes densités se rencontrent dans les vergers de mangues et d'agrumes (Bouyer et al. 2010b). L'étude des traits de vie dans différentes conditions de température et d'humidité relative de trois souches de l'espèce étudiée constitue un de nos thèmes de recherche.

Tous ces facteurs environnementaux déterminent la répartition des glossines dans la nature. Ces dernières sont typiquement africaines sévissant sur environ 10 millions de km² et couvrant 37 pays subsahariens, soit le tiers de la superficie totale du continent africain. L'aire de répartition va du 14° degré latitude Nord au 19° degré latitude Sud (du Sénégal à l'Afrique du Sud) (FAO 2002) où la température est supérieure à 20°C et la pluviométrie annuelle supérieure à 500 mm (Figure 1).

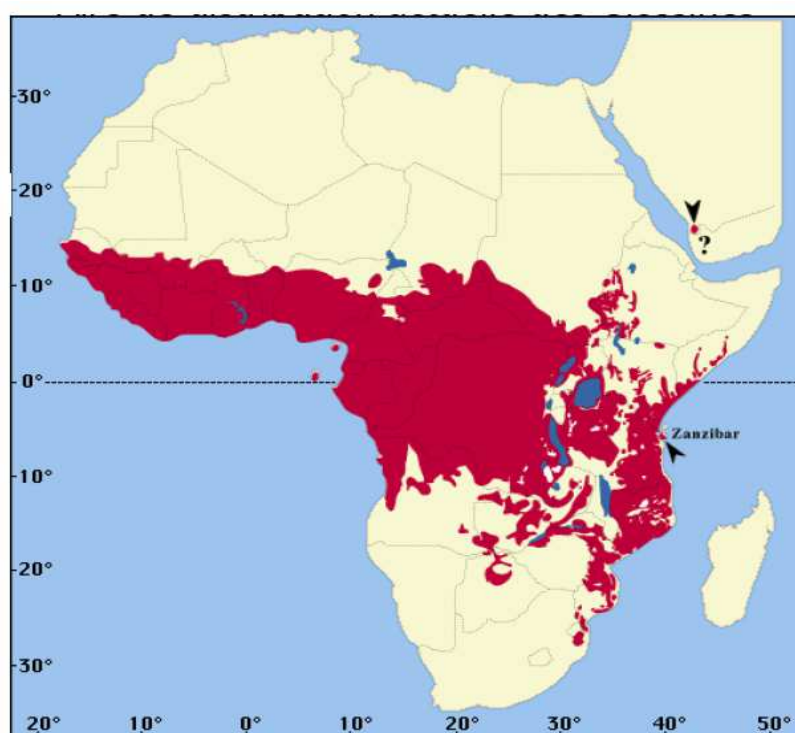


Figure 1. Carte de répartition de glossines (Source : « Les glossines ou mouches tsé-tsé », Logiciel d'identification et d'enseignement (CD) Orstom-Cirad/EMVT, Editions ORSTOM, collection «Didactiques», 1998)

Notons qu'avec la pression anthropique associée à la variation climatique (baisse de la pluviométrie), la limite historique nord de répartition des glossines se déplace progressivement vers le sud. Par exemple au Burkina Faso, en un demi-siècle sans lutte, la limite nord s'est déplacée de 50 à 150 km vers le sud (Courtin et al. 2010) ; Figure 2). L'homme de par ses activités, fragmente les paysages glossiniens créant ainsi une nouvelle dynamique de

structuration qui semble être à l'origine d'une différenciation entre souches. En effet, des essais de croisement entre populations de *G. p. palpalis* originaires du bas-Zaïre et du Nigeria ont donné une descendance mâle stérile ce qui semblerait indiquer une spéciation (Gooding et al. 2004). Aucune différence morphologique n'était pourtant remarquable, laissant penser à des cas d'espèces cryptiques. Des études de structuration des populations de *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides* par des outils génétiques montrent bien ces tendances d'isolement (Solano et al. 2000; De Meeûs et al. 2012; De Meeûs et al. 2014; De Meeûs et al. 2015). Par ailleurs, des différences morphologiques au niveau de la tête ont été démontrées entre des souches de *G. p. palpalis* de Côte d'Ivoire et du Congo (Gouteux and Dagnogo 1985). Ces différentes situations de dynamique de populations peuvent servir de base pour définir de nouvelles stratégies de contrôle des glossines par l'utilisation de la technique de l'insecte stérile (mises en place de barrières artificielles par exemple).

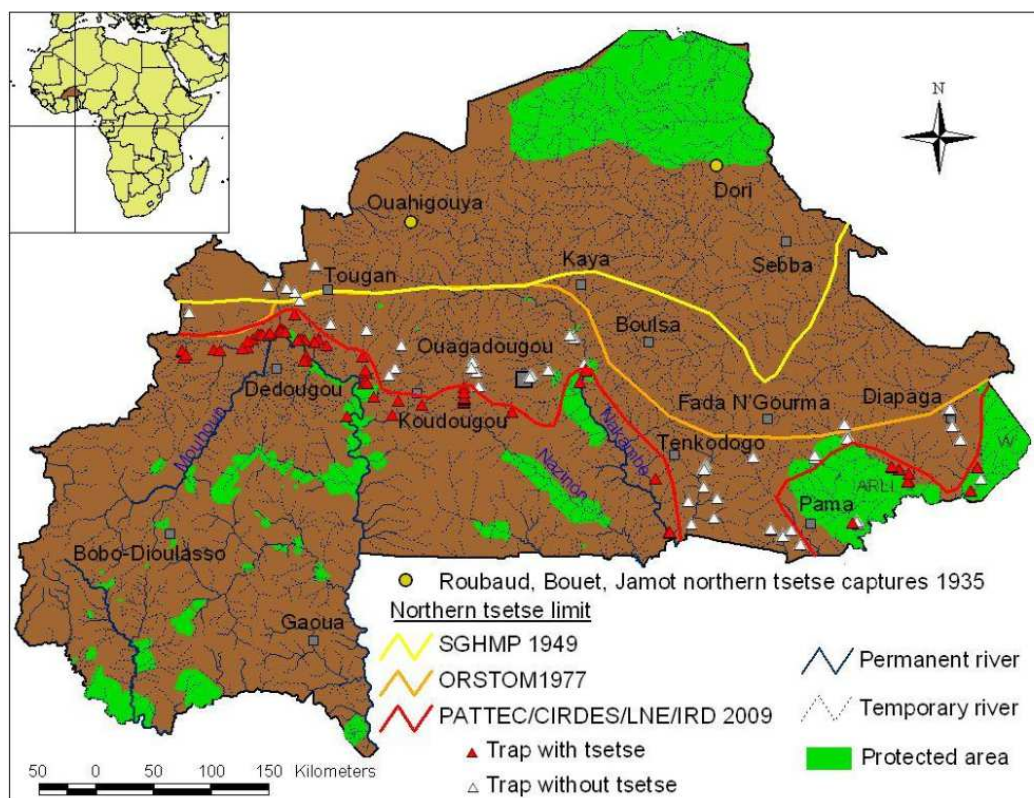


Figure 2. Evolution de la limite nord des glossines au Burkina Faso avant le temps (Source : (Courtin et al. 2010))

Chez les glossines, les deux sexes sont hématophages et effectuent tous les 2 à 4 jours environ un repas de sang équivalent à leur poids corporel (Itard and Cuisance 2003b). En plus du poids, chez les femelles, la quantité de sang absorbée varie en fonction de l'activité physiologique,

notamment les réserves de graisse et l'état de gravidité (Pollock 1982a; Itard 2000; Launois et al. 2004). Après l'éclosion, la prise du premier repas a lieu entre le premier et le troisième jour. L'intervalle entre les repas varie selon les espèces, les conditions climatiques locales, la présence d'hôtes nourriciers et l'activité sexuelle (Pollock 1982a). La prise de sang est plus fréquente pour les femelles que pour les mâles. Les mâles se gorgent environ tous les 4 jours alors que les femelles prennent 3 repas au cours de la gestation. Le sang est l'élément de base de tout le cycle biologique de la glossine : activité ovarienne, fécondation, développement de la larve, achèvement de la croissance de la jeune mouche et stockage de graisse pour les périodes difficiles (Launois et al. 2004). Les tsé-tsé notamment les espèces du sous-groupe *palpalis* sont très opportunistes, capables de s'adapter à une large gamme d'hôtes domestiques et sauvages allant des reptiles aux bovidés en passant par les suidés et l'homme (Bouyer 2006). Ce comportement alimentaire des glossines leur permet de s'adapter à une biodisponibilité en hôte variable dans le temps et dans l'espace et de coloniser des écosystèmes à niveaux d'anthropisation très variés. Dans le cadre de la TIS, les mâles stériles lâchés doivent s'adapter aux conditions naturelles, chercher des endroits refuges puis espérer rencontrer un hôte pour s'alimenter. Il est probable qu'un nombre important de mâles meurent sans avoir rencontré un hôte nourricier. La durée de vie active (période où le mâle est compétitif) en absence de nourriture est un paramètre important à intégrer dans la stratégie de lutte. L'étude de la survie des mâles stériles ténéaux à partir de leurs réserves de graisse constitue justement un de nos thèmes de recherche.

Les glossines se caractérisent par leur mode de reproduction de viviparité (Buxton 1955; Itard 2000). Dans la nature, les femelles de glossines s'accouplent précocement avant la prise de leur premier repas sanguin ou à peu près au moment de ce dernier (Pollock 1982a). Le meilleur âge pour l'accouplement est de 3 à 4 jours pour les femelles et 6 à 8 jours pour les mâles (Kaboré 2003). En général, la femelle s'accouple une seule fois au cours duquel elle remplit ses spermathèques de sperme du mâle, qui y demeure à l'état actif pendant toute son existence. L'œuf issu de la fécondation s'implante dans l'utérus et la larve est alimentée par des sécrétions d'une glande lactée. Selon l'espèce et les conditions climatiques, la vie larvaire dure entre 8-10 jours (Itard 1984; Childs 2011). A 25°C, une femelle donne naissance à une larve entièrement développée tous les 9-10 jours sauf la première qui est larviposée à 17-20 jours d'âge (Pollock 1982a; Leak 1999; Hargrove 2004; Childs 2011). Pour une durée de vie de 3 mois, une femelle donne naissance à entre 8-10 larves, ce qui représente un taux de production plutôt faible. Les lieux de ponte sont généralement situés à proximité de l'eau en saison sèche, et plus éloignés

des rives en saison des pluies. Une fois déposée, la larve s'enfonce rapidement dans le sol à 2-8 cm de la surface. La durée du stade pupal varie avec l'espèce, le sexe, la température. Elle est plus courte lorsque la pupa aboutit à une femelle. Dans les régions où la température oscille autour de 25°C, elle dure environ entre 25 et 30 jours. La nymphe vit sur des réserves nutritives emmagasinées par la larve pendant son stade intra-utérin. L'émergence de la mouche se fait par une rupture circulaire de l'extrémité antérieure du puparium, sous la poussée rythmique du ptilinum. La mouche nouvellement éclore et n'ayant pas encore pris son premier repas sanguin est dite ténérale. Elle devient adulte après la prise de celui-ci.

1.2.2. Elevage de mouches tsé-tsé

1.2.2.1. Intérêts de l'élevage des mouches

Il est difficile d'évaluer les bénéfices de l'élevage des insectes d'une manière générale. Mais disons que fondamentalement, il est plus qu'utile dans le domaine de la recherche entomologique car c'est la meilleure voie par laquelle il est possible de comprendre l'identité, la biologie, l'écologie, le comportement et la place dans la biodiversité d'une espèce de ravageur ou de vecteur donnée.

Plusieurs intérêts motivent l'élevage des insectes, la première étant son rôle dans l'avancement de la recherche scientifique. En effet, grâce à la colonisation des mouches, la découverte de nouveaux insecticides et la mise au point de leurs formulations sont possibles. En menant des tests de mortalité sur des insectes cibles, on arrive à déterminer la dose létale nécessaire, ce qui permet d'économiser en temps, en énergie et en argent. Un autre intérêt est le développement de méthodes biologiques pour le contrôle de certains insectes nuisibles. Grâce à l'élevage de ces insectes, il a pu être identifié des parasites ou des prédateurs de ces insectes qui sont utilisés pour lutter contre eux. De plus, il y a le développement de la technique de l'insecte stérile par l'utilisation du mâle de l'espèce cible rendu stérile par irradiation pour combattre la même espèce. Un autre intérêt est aussi la possibilité de préserver des spécimens d'espèces de mouche en insectarium en cas d'éradication pour des raisons d'intérêt scientifique.

1.2.2.2. Colonisation

La colonisation des glossines peut se faire par une ou plusieurs méthodes :

- **Colonisation à partir de pupes collectées sur le terrain**

La colonisation à partir de pupes collectées sur le terrain nécessite une bonne connaissance des gîtes de ponte, qui se situent en général dans des endroits bien abrités, au sol meuble et

sablonneux notamment dans des forêts galeries et des plantations de manguiers pour ce qui est des espèces riveraines *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides* (Buxton 1955; Pollock 1982b). Le sol est minutieusement fouillé jusqu'à une profondeur de ~ 4 cm et tamisé (maille n°7). Les pupes sont ensuite mises dans un tulle et emballées avec du coton puis gardées dans une boîte isotherme (24 - 25°C) et transportées à l'insectarium. Les pupes une fois à l'insectarium doivent être gardées en quarantaine pour éviter la contamination de la colonie mère car des pupes ramassées dans le sol en conditions naturelles peuvent abriter des parasitoïdes, bactéries, virus, etc. Les mouches qui émergent sont séparées par sexe, gardées dans des conditions d'élevage puis accouplées suivant l'âge et le ratio adéquat. Cette procédure de colonisation est fastidieuse car nécessite d'explorer de vastes habitats, d'utiliser un nombre important de personnes et d'avoir un temps considérable.

- **Colonisation à partir de mouches collectées sur le terrain**

Cette procédure est plus simple que celle décrite plus haut. Les captures doivent être faites dans des endroits favorables où les densités de mouches sont importantes. Il est préférable de récolter les pièges deux fois dans la journée, c.-à-d. en fin de matinée et en fin d'après-midi pour éviter que les mouches ne souffrent dans les cages de capture. Si la zone de capture n'est pas éloignée de l'insectarium, les mouches capturées peuvent être ramenées à l'insectarium en fin de journée, mises en quarantaine et alimentées. Un échantillon de femelles est disséqué et lorsque le taux d'insémination est >85%, il n'y a plus d'accouplement, dans le cas contraire des mâles sont introduits dans les cages de production suivant le ratio de 1:4 (1 mâle pour 4 femelles) (Opiyo et al. 2006). Ce ne sont que les pupes issues de ces femelles sauvages qui peuvent être reçues dans l'insectarium et la colonie est établie à partir des mouches qui émergent de ces pupes.

- **Colonisation à partir de pupes provenant d'une colonie existante**

C'est la procédure la plus simple car les mouches sont déjà adaptées aux conditions artificielles et des données sur la colonie d'origine existent (productivité, survie, aliment et procédure utilisée, etc.) et peuvent servir dans le nouvel insectarium de guide mais aussi pour évaluer sa performance. L'âge approprié des pupes à transporter est de 2 semaines après larviposition car des pupes complètement développées sont très sensibles aux manipulations et chocs mécaniques (Pollock 1982a). Les procédures de conditionnement et de transport sont détaillées dans (Opiyo et al. 2006). Le transport peut se faire par la route si l'insectarium d'origine et celui d'accueil ne sont pas très distants, sinon il se fait par avion et les pupes sont gardées dans une enceinte à température stable de 24-25°C et une humidité relative >75%. Les pupes une fois à l'insectarium de réception sont transférées dans une salle d'incubation pour émergence.

1.2.2.3. Conditions environnementales de l'insectarium

Le défi de l'élevage des mouches tsé-tsé réside dans la maîtrise des conditions environnementales de l'insectarium. Il s'agit principalement de la température, de l'humidité relative, du cycle et de l'intensité de la lumière. La non-maîtrise de l'un de ces composants peut entraîner des conséquences diverses allant de la baisse de la production à la variation génétique pouvant conduire à une modification comportementale (comme l'incompatibilité) dans le cadre de la TIS avec les mouches tsé-tsé sauvages ou une faible compétitivité sur le terrain.

D'un sous-groupe de glossines à l'autre ou d'une espèce à l'autre, ces conditions notamment la température et l'humidité relative peuvent ne pas être exactement les mêmes et pour une même espèce, ces conditions peuvent varier d'un stade de développement à un autre (Tableau I). En plus de ces conditions climatiques, l'environnement de l'insectarium doit être hygiénique allant de la propreté du personnel au matériel, à l'intérieur et aux alentours de l'insectarium.

Tableau I. Conditions environnementales à l'insectarium (adapté de (Opiyo et al. 2006))

| Condition | Espèce | Temp. (°C) | HR (%) | Lumière (Lux) | Traitement spécial |
|----------------------|-------------------------|------------|--------|---------------|---|
| Elevage | <i>G. p. gambiensis</i> | 24-25 | 80-85 | | |
| | <i>G. tachinoides</i> | 24-25 | 80-85 | | |
| | <i>G. morsitans</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. austeni</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. pallidipes</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. f. fuscipes</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. brevipalpis</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| Alimentation | <i>G. p. gambiensis</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | La réponse à l'alimentation peut être améliorée en couvrant les cages avec un drap sombre |
| | <i>G. tachinoides</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| | <i>G. morsitans</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| | <i>G. austeni</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| | <i>G. pallidipes</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| | <i>G. f. fuscipes</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| | <i>G. brevipalpis</i> | 21-22 | 65-70 | 12-14 | |
| Incubation des pupes | <i>G. p. gambiensis</i> | 23-24 | 75-80 | | Augmenter l'humidité relative à 80-85% 2 jours avant les émergences |
| | <i>G. tachinoides</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. morsitans</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. austeni</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. pallidipes</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. f. fuscipes</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| | <i>G. brevipalpis</i> | 23-24 | 75-80 | | |
| SSPC | <i>G. austeni</i> | 26,5 | 85 | | Transférer des conditions d'incubation aux conditions SSPC dès les 1 ^{ères} émergences |
| | <i>G. pallidipes</i> | 26,5 | 85 | | |
| | <i>G. brevipalpis</i> | 26,5 | 85 | | |

f. : fuscipes ; Temp. : température ; HR : humidité relative ; SSPC : Self-Stocking of Production Cage ou émergence directe des mouches dans les cages de production. C'est un système qui a été développé sur la base de la différence

entre le temps d'émergence des mouches mâles et femelles (Birkenmeyer and Dame 1975). Par exemple à 23-24°C, les émergences durent 6 jours, et les 2 premiers jours, les émergences sont à quasi totalité des femelles et les 2 derniers jours des mâles (IAEA 2003). Le jour avant le début des émergences, les cages de production sont placées en dessus des boîtes contenant les pupes et les mouches qui émergent pénètrent directement dans les cages. Les cages sont remplacées chaque 24 heures. Il permet un sexage automatique des mouches et évite les multiples manipulations manuelles pour la séparation des sexes.

1.2.2.4. Alimentation de la colonie

En fonction de la taille de la colonie, l'alimentation peut se faire *in vivo* (sur bovins, moutons, lapins, etc.) ou *in vitro*. Le système *in vitro* sur membrane en silicone est celui recommandé (Opiyo et al. 2006) car il a un double intérêt. D'abord il permet d'offrir un repas stérile aux mouches et ensuite du fait de la taille de la colonie, le sang peut être collecté et stocké en quantité (congelé) pour plus de sécurité. Le sang utilisé est généralement récolté dans les abattoirs (ou prélevé sur animaux vivants) provenant de bovins ou de porcs ou un mélange des deux en fonction des espèces de glossines. Mais il est connu que toutes les espèces peuvent être maintenues en insectarium à partir de sang de bovin uniquement (Opiyo et al. 2006). Le sang collecté aux abattoirs est immédiatement défibriné mécaniquement (ou par ajout d'anticoagulant) pour éviter la coagulation puis transporté à l'insectarium pour congélation. Un échantillon de sang est ensuite prélevé pour vérifier sa qualité bactériologique. Avant utilisation, le sang est décongelé puis réchauffé à la température de 35-37°C. Il y a deux types de systèmes d'alimentation, à savoir mécanique et automatique (TPU (Tsetse Production Unit)). Pendant l'alimentation il est recommandé de créer de l'obscurité, soit en diminuant l'intensité de la lumière, soit en couvrant les cages de mouches avec un drap noir pour réduire leur distraction. Pour les mouches nouvellement émergées, il faut attendre au moins 24 heures avant de les alimenter. Les mouches sont alimentées une fois tous les trois jours c'est-à-dire trois fois par semaine. Il existe un système d'alimentation appelé "clean feeding" qui permet d'éviter la propagation du virus de l'hypertrophie des glandes salivaires (SGHV) dans les colonies d'élevage. En effet, de nombreuses espèces de mouches tsé-tsé sont infectées par ce virus qui réduit leur fécondité et leur fertilité (Otieno et al. 1980; Sang et al. 1998). Dans les populations naturelles, le mode de transmission du virus le plus répandu est celui vertical c.-à-d. de la mère à la descendance (Jura et al. 1989; Sang et al. 1998). Dans les colonies maintenues en insectarium, la transmission est surtout horizontale durant l'alimentation sur membrane (Feldmann 1994) car un seul plateau de sang peut alimenter plus de 10 ensembles successifs de cages de mouches. En effet, lorsque que les mouches des premières cages sont infectées, en s'alimentant elles laissent les virus sur la membrane et les mouches des cages suivantes sont contaminées en les ramassant. Le contrôle du virus peut se faire soit par l'utilisation de

médicament antiviral comme le "valacyclovir" (Abd-Alla et al. 2012) ou par la gestion du régime alimentaire appelé "clean feeding" (Abd-Alla et al. 2013) ou encore par la combinaison des deux systèmes qui est plus efficace (Abd-Alla et al. 2014). Le "clean feeding" a été développé sur *G. pallidipes* et permet d'empêcher les mouches de ramasser le virus dans le sang déjà utilisé pour l'alimentation des cages précédentes. Ainsi, dans les colonies d'élevage en masse où le virus est présente, l'alimentation commence toujours des plus jeunes mouches (saines) aux plus âgées (les plus infestées par le virus) (Abd-Alla et al. 2013). Ce système permet en 28 mois de supprimer le virus de la colonie même si le niveau initial de prévalence est élevé (Abd-Alla et al. 2014).

1.2.3. Lutte anti-vectorielle

1.2.3.1. Stratégies de lutte

La lutte contre les TAA peut se faire par la lutte anti-vectorielle, la chimiothérapie ou l'élevage d'animaux trypanotolérants. Malheureusement ces deux dernières stratégies connaissent des limites liées respectivement au développement de résistances contre les mêmes molécules utilisées depuis des décennies (Geerts et al. 2001) et à la faible adoption des races trypanotolérantes par les producteurs du fait de leur faible productivité (N'Dama, Baoulés, Muturu, moutons et chèvres Djallonké, chèvres guinéennes, chèvres de Casamance et poneys Kirdi) (Murray et al. 1984; Trial et al. 1993; Belemsaga 2001).

La lutte anti-vectorielle reste la plus efficace jusqu'à nos jours mais peut être utilisée en complémentarité avec la chimiothérapie pour assurer un contrôle efficace et durable. Cette stratégie, qui consiste à supprimer définitivement ou à contrôler le vecteur pour aboutir à l'arrêt de la transmission du parasite, sera détaillée plus bas.

1.2.3.2. Prérequis pour la mise en place d'un programme de lutte intégrée

La mise en place d'un programme national de lutte contre les tsé-tsé nécessite un certain nombre de considérations pour assurer une lutte ayant un bon rapport coût-efficacité. Il s'agit :

- des données socio-économiques de base: ces données sont utilisées pour évaluer l'impact socio-économique de la lutte (Shaw et al. 2013; Bouyer et al. 2014). Il s'agit de la production de lait, de viande, le taux de mises-bas, les mortalités, les ventes et prix de vente unitaire, etc. D'autres considérations de base sont à prendre en compte, comme les caractéristiques sociales des populations impliquées et leurs capacités d'intervention et la valorisation envisagée de la zone après libération, y compris la gestion environnementale ;

- des données entomologiques de base : la distribution, l'abondance, la structure de la population et son isolement (isolement génétique ou physique de la population cible par rapport à celle la plus proche) (Solano et al. 2009; Bouyer et al. 2010a; Solano et al. 2010; Adam et al. 2014; De Meeûs et al. 2014; De Meeûs et al. 2015) ;
- des données parasitologiques de base : la prévalence et l'incidence de la TAA (Seck et al. 2010; Adam et al. 2012; Sow et al. 2013b). En fonction de la situation éco-épidémiologique, le type de cycle de TAA doit être défini : selvatique, interface, endémique et mécanique (Van den Bossche et al. 2010; Bouyer et al. 2013a). La stratégie peut différer d'un type à l'autre car les acteurs impliqués sont différents (voir section 1.1.1). Les données entomologiques et parasitologiques sont utilisées ultérieurement pour évaluer le niveau de réussite du programme de lutte ;
- des données environnementales de base: la diversité, l'abondance de la faune non cible peuvent être utilisées pour évaluer l'impact socio-environnemental à long terme du projet (ISRA/LNERV 2014).

La combinaison de toutes ces données de base permet de définir la stratégie fondamentale à mettre en œuvre pour atteindre soit l'éradication de la population, soit le contrôle de la densité de glossines à long terme en dessous du seuil de transmission des trypanosomes (Bouyer et al. 2013a) ; Figure 3).

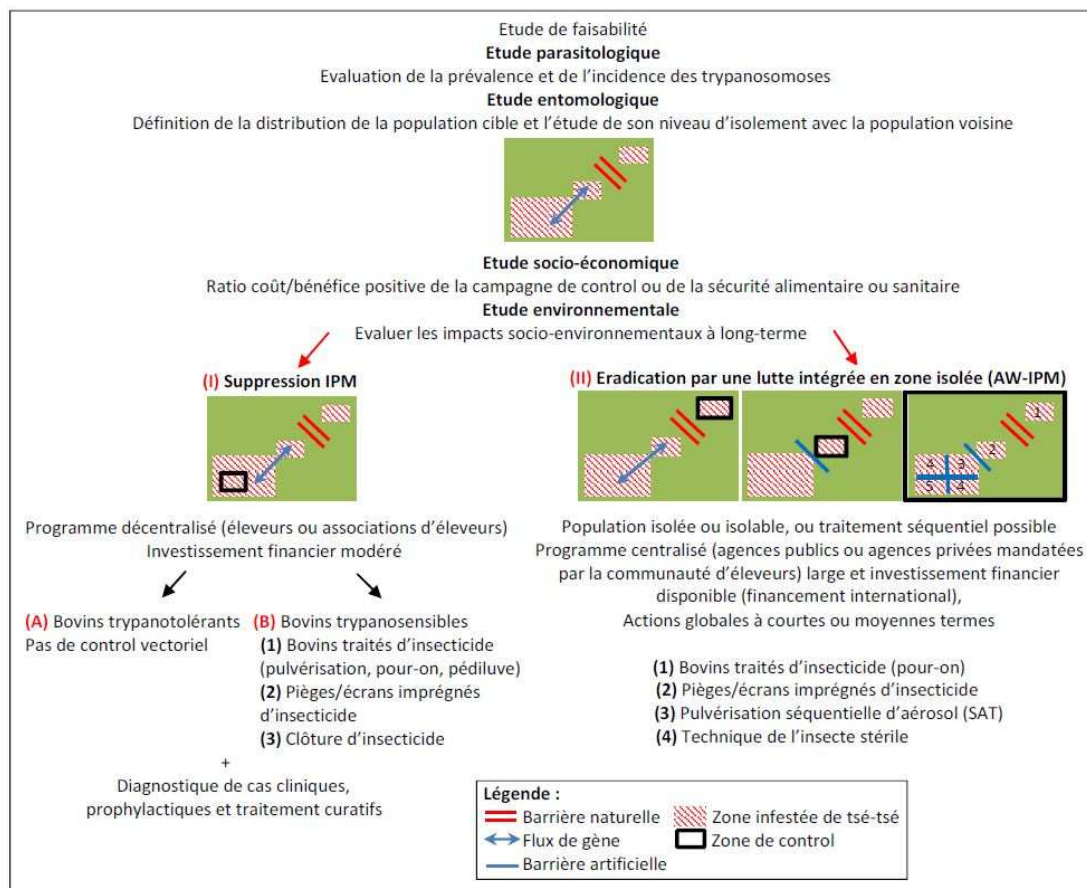


Figure 3. Cadre de décision pour le contrôle des mouches tsé-tsé et des trypanosomoses animales africaines. Le choix de la stratégie de lutte dépend de la situation environnementale et socio-économique (adapté de (Bouyer et al. 2013a))

Deux catégories d'outils de contrôle contre les glossines sont actuellement utilisées : le lâcher de mâles stériles (TIS) et les méthodes chimiques.

1.2.3.3. Lutte chimique

La lutte chimique a subi une évolution dans le temps. En effet, les insecticides rémanents utilisés dans les années 50 par pulvérisation aérienne rémanente (avions ou hélicoptères) avec des effets néfastes sur la faune non cible ont été remplacés par des méthodes économiquement moins chères, plus spécifiques, et écologiquement durables utilisant des insecticides non rémanents, les pyréthrinoides : les pièges/écrans imprégnés d'insecticides, les appâts vivants et la pulvérisation séquentielle d'aérosol (SAT) (Rayaisse 2011a).

- **Pulvérisation d'insecticide**

L'épandage d'insecticide peut être terrestre ou aérien en fonction des objectifs visés et de la nature de la zone à traiter. La pulvérisation terrestre se fait sur les parties basses de la végétation

avec un insecticide à longue rémanence (dieldrine) en solution aqueuse. Elle est souvent utilisée à petite échelle dans les habitats à forte densité végétative comme les bois sacrés. La pulvérisation au sol vise les gîtes de repos des glossines car ce sont les endroits où l'insecticide à effet rémanent aura un effet maximal sur la tsé-tsé et un effet minimal sur les autres formes de vie animale. La pulvérisation aérienne (SAT) utilise un produit non rémanent (endosulfan ou deltaméthrine sont généralement les insecticides de choix) à des concentrations très faibles donc plus respectueuses de l'environnement que la pulvérisation au sol. L'appareil vole à une vitesse comprise entre 250-300 km/h à 10-15 m en dessus de la canopée. Les glossines sont tuées au contact direct avec une microgoutte du produit. L'insecticide n'affectant pas les pupes dans le sol, l'idée est donc de planifier les opérations de telle sorte que les premières mouches qui émergeront après la pulvérisation ne puissent se reproduire. Le temps entre cycles de pulvérisation doit donc être inférieur à la durée de la première larviposition (temps entre l'émergence des femelles et la production de la première pupa) qui est fonction de l'espèce et de la température (Hargrove 1994; Hargrove 2004). Il est conseillé de répéter les cycles de pulvérisation deux (2) jours avant la première larviposition et de poursuivre au moins jusqu'à deux pulvérisations après l'émergence des dernières pupes femelles pondues avant le début des opérations de pulvérisation. A 24°C il est préconisé 4 cycles de pulvérisation si plus de 99% de femelles adultes sont détruites à chaque cycle (Hargrove 2004; Childs 2011). La SAT a été utilisée avec succès dans le Delta de l'Okavango, Botswana (Kgori et al. 2006) et sur 48 000 km² dans une zone de savane au Zimbabwe (Shereni 1990) pour éliminer les glossines. Récemment utilisée dans le cadre de la PATTEC au Ghana et au Burkina Faso sur la branche descendante du fleuve Mouhoun (Black Volta), elle a permis une réduction importante des densités mais pas une élimination, (Adam et al. 2013; Sow 2013a). En quelque 2-3 mois, la SAT a permis d'atteindre une réduction significative des densités mais son coût reste élevé pour être utilisé dans un contexte de simple contrôle car les acquis seront de courte durée si des dispositions ne sont pas prises pour le maintien de la pression et pour éviter la ré-invasion.

- **Pièges/écrans imprégnés d'insecticides**

Les pièges et les écrans jouent le rôle d'attractifs par leurs couleurs (le bleu attire les glossines et le noir sert à favoriser la pose). Souvent moins attractifs pour certaines espèces (Vale 1982), leur efficacité est améliorée par adjonction d'attractifs olfactifs comme l'octénol, le méta-crésol, l'acétone et le phénol (Vale 1974; Politzar and Merot 1984b; Laveissière et al. 2003; Omolo et al. 2009; Rayaisse et al. 2010). Les pièges sont utilisés pour l'étude de l'écologie, l'abondance, la dispersion des glossines et l'évaluation de la lutte. Les plus utilisés, notamment

pour les espèces du groupe *palpalis*, sont les pièges biconiques (Challier and Laveissière 1973) généralement dans les zones de TAA et les pièges monoconiques (Laveissiere and Grebaut 1990) dans le cas des foyers de THA. Les supports attractifs (pièges et écrans) sont rendus toxiques par imprégnation d'insecticides dont le plus utilisé de nos jours est la deltaméthrine en raison de sa toxicité sur les glossines, sa stabilité à l'air et dans l'environnement (sans toutefois se bio-accumuler) et son coût raisonnable. Les pièges et écrans imprégnés ont un double intérêt : lutte contre les glossines et barrière contre une nouvelle colonisation des zones déjà assainies. Des écrans de petites tailles (0,75 m x 0,5 m ; 0,5 m x 0,25 m) ont été conçus récemment et semblent avoir la même efficacité que ceux de grandes tailles (1 x 1 m) mais avec un avantage dû au fait qu'ils sont moins coûteux et moins encombrants pour le transport (Esterhuizen et al. 2011; Rayaisse et al. 2011b). La lutte par piégeage permet de réduire la densité de population initiale jusqu'à 95 à 99% (Sow 2013a) mais atteint un niveau de stabilisation en deçà duquel, le piège ne semble plus avoir d'effet sur les densités. Cette stabilisation peut être liée à une réduction de l'efficacité du système de lutte (les glossines les plus proches de pièges sont tuées plus facilement que les plus distantes) (Gouteux et al. 2001), une régulation naturelle densité-dépendante des populations (Bouyer et al. 2010b), ou à un comportement d'évitement des pièges par les glossines (Amsler et al. 1994) ou encore à une ré-invasion permanente à partir des zones périphériques (Bouyer, 2006).

- **Appâts vivants**

Les deux sexes de glossines sont hématophages et de ce fait, le traitement du bétail avec des insecticides par *pour-on* ou pulvérisation par formulation aqueuse peut être efficace contre les glossines (Hargrove et al. 2000). Cette technique a été efficacement utilisée contre *G. pallidipes* en Ouganda (Okello-Onen et al. 1994) et au Zimbabwe (Thompson et al. 1991), *G. m. submorsitans* et *G. p. gambiensis* au Burkina Faso (Bauer et al. 1995), *G. pallidipes* et *G. morsitans*, *G. brevipalpis*, *G. austeni* en Tanzanie (Fox et al. 1993). Une réduction considérable de l'incidence de la TAA a été observée à l'Est de la Zambie par le traitement des animaux avec 1% de cyfluthrine en *pour-on* (Van den Bossche et al. 2004). Comme le piégeage, cette technique présente des limites liées aux difficultés d'accès des bovins à certains endroits comme les bois sacrés ou les zones protégées. Dans ces endroits, les glossines s'alimentent sur des hôtes alternatifs, ce qui permet d'entretenir la population dans un système sources-puits (Bouyer 2006). Récemment, elle a été associée efficacement avec le piégeage et les SAT dans les différents projets PATTEC au Burkina Faso, Ghana, Sénégal, Mali, Ethiopie et Kenya.

1.2.3.4. Technique de l'insecte stérile

1.2.3.4.1. Historique et définition des concepts de la TIS

- **Historique**

La technique de l'insecte stérile (TIS) est une méthode biologique de contrôle, de prévention ou d'éradication d'insectes nuisibles où des milliers d'individus stériles sont lâchés (Vreysen 2001). Elle est généralement appliquée comme une composante d'une lutte intégrée en zone isolée naturellement (îles) ou génétiquement (absence de flux de gènes entre populations) ou par une barrière artificielle (AW-IPM) (Klassen 2005a). La stérilisation d'insectes par irradiation a été développée dans les années 1950 par des entomologistes américains (Klassen and Curtis 2005b). Cette approche a été utilisée pour la première fois aux USA contre la lucilie bouchère, parasite mortel pour le bétail qui causait d'énormes pertes en viande et lait et la mort de l'animal qui survient 7 à 10 jours après en cas d'absence de traitement. Depuis les années 1950, du fait de son impact socio-économique, la TIS a été utilisée avec succès dans tous les continents pour l'éradication de nombreux insectes nuisibles afin d'assurer une production végétale et animale saine et améliorer la santé humaine.

Quelques exemples de programmes d'éradication réussis dans le monde :

- La lucilie bouchère : *Cochliomyia hominivorax*, est une mouche dont la larve est pondue dans les plaies ouvertes ou atteintes cutanées suffisantes, et est responsable d'une myiase. Elle a été éradiquée par lâcher de mâles stériles sur l'île Curaçao (175 km²), littoral du Venezuela (Baumhover et al. 1955), dans toute la Floride (Meyer and Simpson 1995), du Sud et l'Ouest de l'Amérique (Bushland 1985; Klassen 1989), dans toute l'Amérique Centrale (Wyss 2000), en Lybie (Lindquist et al. 1992). L'éradication de la lucilie bouchère a permis un accroissement significatif de la production de viande et de lait de qualité.
- Les mouches de fruits : *Ceratitis capitata* a été éradiqué du Mexique, de la moitié du Guatemala (Hendrichs et al. 1983; Villasenor et al. 2000), des USA : la Floride et la Californie (Dowell et al. 2000; Barry et al. 2004). *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (mouche de melon) a été éradiqué de Okinawa et du Japon par lâcher de mâles stériles (Yamagishi et al. 1993; Kuba et al. 1996). Dans les années 1990, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) a également été éradiquée en Colombie et au Canada grâce à l'application de la TIS (Dyck et al. 1993). L'éradication des mouches de fruits a favorisé une relance économique très importante par l'amélioration significative de la production des fruits et l'exportation vers d'autres pays. Notons que pour des raisons techniques (maintien d'une quarantaine effective par exemple)

et/ou économiques, dans de nombreux pays, des programmes de lutte intégrée par utilisation de la TIS existent avec pour but la réduction et le maintien de la population des mouches de fruits le plus faible possible pour qu'elle ne soit plus un problème économique et sanitaire à l'exportation (Hendrichs et al. 2005).

- Les mouches tsé-tsé : la lutte intégrée par lâcher de mâles stériles a été utilisée avec succès contre les glossines. En effet, au Burkina Faso dans la zone pastorale de Sédougou, trois espèces de glossines (*G. p. gambiensis*, *G. morsitans submorsitans* et *G. tachinoides*) ont été éradiquées dans les années 1980 sur 3000 km² (Cuisance et al. 1984; Politzar and Cuisance 1984a). Dans la même période, *G. p. palpalis* a été éradiquée au Nigéria sur près de 1500 km² (Takken et al. 1986). Malheureusement, l'éradication dans ces deux pays ne sera pas durable du fait d'une ré-invasion par absence d'une quarantaine des zones assainies. Dans les années 1994, par application d'insecticides sur les animaux et pose de pièges/écrans imprégnés suivi de lâcher aérien de 7,8 millions de mâles stériles, *G. austeni* a été définitivement éradiqué sur l'île de Zanzibar (Vreysen et al. 2000). Depuis septembre 1996, aucune glossine sauvage n'a été capturée sur l'île et la transmission de la trypanosomose est arrêtée (Vreysen et al. 2014). D'autres opérations avec utilisation de la TIS sont en cours au Sénégal et en Ethiopie avec de grands espoirs.

- **Définition de concepts**

La TIS était jusqu'en 1990 considérée comme une technique appropriée uniquement pour éradiquer certains insectes ravageurs. Avec l'amélioration faite dans les techniques d'élevage des insectes (Parker 2005), qui améliore significativement le rapport coût-efficacité de la TIS (Caceres et al. 2004), et la restriction de l'utilisation systématique des insecticides, la diffusion des résistances à ces insecticides, l'accroissement de la demande en produits organiques sains et les difficultés à établir des mesures de quarantaine efficaces pour maintenir une zone libérée de ravageurs, la TIS est maintenant appliquée dans trois options stratégiques que sont : la suppression, l'éradication et la prévention.

- **La suppression** : c'est l'utilisation de mesures de lutte dans une zone infestée pour réduire la densité de la population des ravageurs (FAO 2005). L'objectif de cette stratégie est de maintenir la population d'insectes à un faible niveau de telle sorte qu'ils ne soient plus un obstacle pour l'économie et/ou la santé. La suppression nécessite une intervention continue pour maintenir la pression et c'est à ce moment que la TIS peut être appliquée pour finaliser l'éradication.

- **L'éradication** : c'est l'utilisation des moyens de lutte pour éliminer jusqu'au dernier individu, la population d'insectes nuisibles (Klassen 2005a). L'exemple classique est celui de *G. austeni* au Zanzibar (Vreysen et al. 2000). Toutefois, en santé publique, le terme éradication prend une dimension plus globale car elle s'entend par l'extinction du ravageur jusqu'au niveau espèce (WHO 1998b). C'est par exemple le cas de l'éradication mondiale de la variole (OMS 1980). L'éradication ne demande pas des mesures d'intervention continue une fois que le niveau zéro est atteint. La stratégie d'éradication est soit appliquée pour éliminer une population de ravageurs naturellement établie (cas de *G. austeni* au Zanzibar (Vreysen et al. 2000)), soit pour éliminer une espèce exotique invasive pour éviter son installation, cas de la myiase à *C. hominivorax* en Lybie (Lindquist et al. 1992). Une éradication ne concernant qu'une population d'une espèce et non pas l'espèce au niveau global est aussi qualifiée d'élimination.

- **La prévention** : c'est l'usage des mesures de lutte dans une zone indemne pour éviter l'installation d'un insecte ravageur. Elle est souvent appliquée dans les zones à risque ou les mesures de quarantaine ne sont pas suffisantes pour éviter l'infestation.

1.2.3.4.2. Prérequis pour réussir un programme utilisant la TIS

L'utilisation de la TIS dans le cadre d'une approche intégrée contre des insectes nuisibles, particulièrement les mouches tsé-tsé, nécessite cinq conditions à respecter (Vreysen et al. 2000; Vreysen 2001) :

- La disponibilité de données écologiques sur l'espèce cible. En effet, l'application de la TIS dans le cadre d'une lutte intégrée nécessite une bonne connaissance de la biologie de l'insecte cible. Il s'agit entre autres de la densité initiale, de la dynamique de la population dans le temps et dans l'espace, sa structure démographique comme l'âge et le statut de reproduction, le comportement d'accouplement, les hôtes préférentiels, les types de végétation, le niveau d'isolement (physique et/ou génétique) de la population cible. L'analyse de toutes ces données permettra de définir les outils de suppression à utiliser, le timing d'application des activités, le ratio de mâles stériles à lâcher dans le temps et dans l'espace, le suivi et l'évaluation du programme.

- La faisabilité sur le plan économique et technique de coloniser et de produire en masse l'insecte cible. Des avancées significatives ont été faites à ce niveau de telle manière qu'aujourd'hui, l'installation locale d'une unité de production en masse dans une région cible n'est plus une nécessité car il est possible d'utiliser des mâles produits par une unité existante dans un pays donné pour éradiquer les glossines d'un autre, mais à la condition qu'il y ait

compatibilité et compétitivité entre les souches. C'est le cas de *G. p. gambiensis* entre la souche BKF, originaire du Burkina Faso et en élevage au CIRDES, et celles du Mali et du Sénégal (Pagabeleguem 2012a; Mutika et al. 2013; Vreysen et al. 2013a).

- L'existence de méthodes capables de réduire drastiquement la densité des insectes cibles. En effet, la TIS n'est efficace que lorsque la densité est faible (Vreysen 2001). Cette réduction de la population peut être faite très efficacement par pulvérisation aérienne et/ou au sol d'insecticide à faibles doses (Kgori et al. 2006; Adam et al. 2013), la pose d'écrans et/ou de pièges imprégnés d'insecticides (Green 1994; Sow 2013a), ou encore le traitement épicutané du bétail (Hargrove et al. 2000; Van den Bossche et al. 2004).

- Une compétitivité optimale des mâles stériles : le programme de la TIS ne peut-être un succès que si les mâles produits en élevage, rendus stériles et relâchés survivent longtemps, se dispersent pour rencontrer le maximum de femelles puis s'accouplent afin de leur transférer le sperme stérile (Vreysen 2001). Aussi, les mâles stériles doivent avoir une bonne aptitude d'accouplement pour compétir avec les mâles sauvages dans l'environnement naturel.

- Un sperme des mâles stériles aussi compétitif que le sperme des mâles sauvages : durant l'accouplement, le sperme est transféré à la mouche femelle et les spermatozoïdes migrent dans les spermathèques puis sont stockés pendant tout le reste de sa vie (Vreysen and Van Der Vloedt 1995b). De la même façon, après l'accouplement avec un mâle stérile, le sperme stérile reste stocké dans les spermathèques et par conséquent aucune progéniture ne sera produite (Van der Vloedt et al. 1978). Il arrive que les femelles acceptent des accouplements multiples au cas où les spermathèques ne sont pas remplies au premier accouplement (Bonomi et al. 2011), mais cela ne constitue pas un obstacle pour la réussite de la TIS si le sperme stérile a une bonne motricité et une bonne viabilité. En effet, une femelle dont les spermathèques sont remplies à 90% de sperme stérile (au premier accouplement) et 10% de sperme fertile (au second accouplement) est stérile à 90% si le sperme stérile est aussi compétitif que le sperme fertile (Vreysen 2001).

1.2.3.4.3. Avantages et inconvénients de la technique

La TIS présente de nombreux avantages (Vreysen 1995a; Vreysen 2001) parmi lesquels :

- sa spécificité d'espèce car la technique n'attaque que l'insecte cible, de ce fait, la technique est sans effet sur l'environnement car ne contamine pas l'habitat dans lequel les mouches ont été lâchées ;

- le non développement de résistance aux effets des mâles stériles du fait de la complexité du développement d'un tel comportement, toutefois déjà rapporté chez les mouches des fruits (McInnis et al. 1996) ;
- la méthode est applicable en saison sèche et en saison des pluies ;
- la TIS est plus efficace lorsque les densités de populations sont faibles (alors que les méthodes chimiques sont moins efficaces à faible densité). Chez les glossines, du fait d'un faible taux de reproduction, les densités de populations naturelles sont généralement faibles, donc ne nécessitant pas de grandes quantités de mâles stériles comparativement à d'autres espèces d'insectes qui sont contrôlées dans les mêmes conditions.

La technique présente néanmoins quelques limites (Vreysen 1995a; Vreysen 2001) :

- elle n'est efficace que lorsque la densité de la population cible est faible, d'où la nécessité d'appliquer une approche de lutte intégrée en réduisant en amont la population à l'aide des méthodes chimiques ;
- la faible capacité de reproduction des mouches tsé-tsé rend la technique financièrement coûteuse, car installer une colonie et produire en masse des mâles stériles prend beaucoup en temps et en logistique (Parker 2005).

1.2.3.5. Etat des lieux des campagnes de lutte entreprises dans le cadre de la PATTEC

En 2000, les chefs d'Etats et Gouvernements Africains ont pris l'engagement de combattre le principal obstacle au développement de l'agriculture Subsaharienne, la trypanosomose animale africaine transmise par les glossines, en lançant une campagne d'envergure, la Pan-African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign (PATTEC) (Kabayo 2002). Sous les auspices de la PATTEC-UA, six projets pilotes pour une durée de six ans ont été initiés pour créer des zones libérées durablement de la mouche tsé-tsé et de la trypanosomose dont trois en Afrique de l'Est que sont l'Ethiopie, le Kenya et l'Ouganda et trois en Afrique de l'Ouest dont le Burkina Faso, le Mali et le Ghana. D'une région à l'autre, du fait de l'existence de différences entre espèces en cause, leur habitat, leur répartition et les conditions d'élevage, tout un arsenal de techniques de lutte combinées dans des stratégies adaptées à chaque situation particulière a été mis en place. Contrairement à l'Ethiopie où une éradication définitive est possible à cause de l'isolement physique des espèces en cause, dans les cinq autres pays, l'éradication durable demande une approche plus globale et concertée.

Au Burkina Faso, la première phase du projet a débuté en 2007 et a consisté à la réduction des densités des mouches sur plus de 40 000 km². Il s'agit d'une lutte intégrée combinant la pose de pièges et écrans imprégnés, la pulvérisation aérienne et au sol, la mise en place de barrières, le traitement épicutané et le traitement des animaux aux trypanocides. A la fin du projet en décembre 2013, les densités des deux espèces concernées (*G. palpalis gambiensis* et *G. tachinoides*) ont été réduites de 95% dans les blocs sud et de 99,6 % au nord (Sow 2013a). Un insectarium de grande envergure, capable de produire 1 000 000 de mâles stériles par semaine est construit à Bobo-Dioulasso dans le cadre de ce projet. Dans le futur, cet insectarium produira des mâles stériles pour les différentes campagnes des pays de l'Afrique de l'Ouest (<http://www.pattec.bf/>).

Au Ghana, la zone d'intervention s'étendait sur 18 000 km² avec deux espèces ciblées : *G. tachinoides* et *G. p. gambiensis* (Adam et al. 2012). La lutte a consisté à l'association de plusieurs méthodes notamment la pulvérisation aérienne de deltaméthrine à faible dose (0.33–0.35 g a.i/ha) sur 6 745 km², correspondant aux zones à végétation très dense et à densité de glossines très élevée, la fumigation sur 100 km², les poses de pièges et écrans imprégnés sur 11 155 km² et le traitement épicutané des bovins de la zone (Adam et al. 2012). Un taux de réduction globale de 98% a été atteint à la fin des opérations de lutte (16,7 glossines comme DAP initiale contre 0,3 à la fin de l'opération) (Adam et al. 2013). Selon Adam et al. (2013), l'échec à parvenir à l'élimination a été attribué à l'échec des aérosols SAT à pénétrer dans les forêts galeries denses dans les limites sud de la zone d'intervention.

Au Mali, sur 240 000 km² de zone infestée, 27 000 km² ont été concernés par le projet PATTEC Mali. Une stratégie de lutte coordonnée, séquentielle sur la totalité de la zone cible a été envisagée combinant les pièges et écrans imprégnés et le traitement épicutané des animaux. Pour des raisons d'instabilités politiques, seuls les études de prospection et le déploiement de pièges et écrans imprégnés sur une partie de la zone ont été réalisés (<http://maliactu.net/sante-animale-un-front-contre-la-mouche-tse-tse/>).

En Ethiopie, le projet a été initié en 1997 suivi d'une phase d'étude de faisabilité (<http://www.most.gov.et/index.php/projects/77-southern-rift-valley-tsetse-eradication-project-step>). C'est avec l'initiative PATTEC, créée en 2000 que la lutte intensive a débuté en 2009 et se poursuit avec pour but final l'éradication des glossines (*G. pallidipes* et *G. f. fuscipes*) de la zone sud de la Vallée du Rift couvrant 25 000 km² par la combinaison de méthodes chimiques et la technique de l'insecte stérile. La combinaison de la pulvérisation d'insecticides, le déploiement de pièges et écrans imprégnés et le traitement des animaux a réussi à réduire à

autour de 90% les densités des mouches sauvages. Ce qui a permis d'enchaîner à partir d'avril 2012 avec le lâcher de mâles stériles (entre 6 000 et 7 000 mâles stériles lâchés par semaine de chaque espèce) dans la vallée du Déné, où la phase d'éradication a débuté (1 000km²) <https://www.iaea.org/newscenter/news/suppressing-tsetse-flies-improve-lives>).

En Ouganda, le projet pilote prévu pour couvrir 29 000 km² n'a pu être réalisé que sur 42% de la surface c'est-à-dire 12 312 km² en raison de la réduction de son budget. En effet, par manque d'anticipation, le montant initial du prêt qui était de 9,4 millions USD a connu en mars 2010 une réduction de plus de la moitié (5 362 500 USD). La lutte a consisté au déploiement en grande quantité de pièges imprégnés d'insecticide. A la fin des activités en décembre 2012, on note une réduction des densités de mouches dans les sites cibles.

Au Kenya, cofinancé par la BAD et le Gouvernement (budget : 10 000 000 USD), le projet a couvert de 2005 à 2011 une superficie de 24 000 km². Le projet a combiné la pulvérisation d'insecticides, le déploiement de pièges et écrans imprégnés d'insecticides et le *pour-on*. A la fin des opérations de lutte, la densité des tsé-tsé ainsi que la prévalence de la maladie ont été réduites à un niveau qui peut être profitable aux producteurs de la zone concernée (<http://www.kenttec.or.ke/index.php/pattec-kenya>).

Les luttes menées depuis des décennies n'ont pu permettre d'éradiquer les glossines que sur moins de 2% des 10 millions de km² de zones infestées (Bouyer et al. 2013b). Il s'agit de l'île de Zanzibar (Vreysen et al. 2000), de la Zambie (Knols et al. 1993), de l'Afrique du Sud et du Botswana (Kgori et al. 2006), même si la situation actuelle mérite d'être évaluée dans les trois derniers cas. Les échecs de lutte sont liés d'une part à la complexité de l'écosystème du vecteur et d'autre part à la pauvreté de la population rurale, les guerres civiles et le manque de concertation entre acteurs des pays infestés afin de combiner les efforts. D'autre part, l'utilisation d'une seule méthode de lutte plutôt qu'une lutte intégrée combinant plusieurs méthodes est souvent une cause des échecs de lutte (Bouyer et al. 2013a; Bouyer et al. 2013b). Les actions communes entreprises récemment dans le cadre de la PATTEC avec une vision globale d'éliminer conjointement les glossines du continent offrent un cadre idéal de concertation entre pays. Là aussi, les acquis engrangés risquent d'être éphémères dans la plupart des pays concernés du fait d'un arrêt rapide des financements et d'une coordination insuffisante des efforts. Dans les pays où les actions sont toujours en cours comme au Sénégal et en Ethiopie (cofinancement Gouvernement - AIEA/FAO), les résultats sont encourageants évoluant vers une éradication des zones cibles.

1.2.3.6. Perspectives d'utilisation de la lutte génétique

Le système de bactéries symbiotiques est connu être répandu chez les arthropodes (Minard et al. 2013; Jupatanakul et al. 2014). Chez les glossines, il existe trois populations de bactéries symbiontes : *Wigglesworthia*, *Sodalis* et *Wolbachia* qui sont impliquées dans le trait de vie biologique de leurs hôtes. Les deux premières sont transmises verticalement de la mère à la progéniture via les sécrétions laiteuses (Pais et al. 2008). *Wigglesworthia* est une symbionte obligatoire qui colonise toutes les espèces de glossines (Aksoy 2000; Geiger et al. 2007). Elle joue un rôle important dans la complémentation nutritionnelle, la fécondité et la capacité vectorielle des glossines. En effet, cette bactérie synthétise des vitamines du groupe B supplémentant le déficit alimentaire de leur hôte (Sassera et al. 2013). Il a été démontré qu'une population de tsé-tsé dépourvue de *Wigglesworthia* stérilise les femelles mais pas les mâles et succombe rapidement à l'infection des trypanosomes (Pais et al. 2008; Wang and Aksoy 2012; Weiss et al. 2012). La bactérie induit chez la glossine la transcription du gène PGRP-LB qui à son tour régule la population bactérienne et contrôle l'infection parasitaire chez les tsé-tsé. Le genre *Sodalis*, contrairement à *Wigglesworthia*, a une distribution hétérogène dans la population naturelle (Geiger et al. 2005) et est présent dans toutes les colonies maintenues en élevage (Doudoumis et al. 2013). Chez la tsé-tsé, notamment *G. p. gambienis*, les densités de *Sodalis* et de *Wigglesworthia* évoluent inversement. La densité de *Sodalis* est stable chez les pupes et augmente chez l'adulte tandis que c'est le contraire avec *Wigglesworthia* (Hamidou Soumana et al. 2013). Ces deux bactéries joueraient un rôle complémentaire chez leur hôte vecteur. L'analyse de leurs génomes montre qu'elles diffèrent au niveau de la thiamine (vitamine B1). *Wigglesworthia* possède la capacité de production des vitamines du groupe B1 alors que *Sodalis* est incapable d'en produire mais assure le transport de ces vitamines (Sassera et al. 2013). *Wolbachia* est la troisième bactérie symbionte des glossines bien que sa distribution reste également hétérogène dans la population de glossines. Elle semble coloniser préférentiellement les espèces du groupe *morsitans* tel que *G. austeni*, *G. m. morsitans*, *G. m. centralis*, *G. swynnertoni*, avec une plus forte prévalence dans les colonies de laboratoire que dans la population naturelle (O'Neill et al. 1993; Cheng et al. 2000; Doudoumis et al. 2012). *Wolbachia* réside dans les tissus reproducteurs (ovaires et testicules) et sa transmission verticale à la descendance est assurée via l'hôte maternel. *Wolbachia* est responsable de la détérioration de la fécondité de la population de son hôte par la féminisation des individus mâles, l'élimination d'embryons mâles et l'incompatibilité cytoplasmique (Serbus et al. 2008; Werren et al. 2008; Saridaki and Bourtzis 2010). L'incompatibilité cytoplasmique induite par

Wolbachia peut être unidirectionnelle ou bidirectionnelle. Dans la forme unidirectionnelle, la conséquence est la létalité embryonnaire qui survient lorsqu'un mâle infecté s'accouple avec une femelle non-infectée. Elle est bidirectionnelle lorsque l'accouplement intervient entre un mâle et une femelle tous deux infectés par des populations de *Wolbachia* différentes. La même conséquence que l'unidirectionnelle s'observe.

Il a été prouvé au laboratoire qu'en absence de *Wigglesworthia* (*Sodalis* et *Wolbachia* étant présents), les mouches perdent l'infection à *Sodalis* dès la troisième génération alors que la densité de *Wolbachia* baisse pour atteindre un niveau normal (Wang and Aksoy 2012).

Le rôle que joue chaque population de bactéries symbiotes dans la biologie de l'hôte vecteur offre des perspectives pour l'amélioration du contrôle des maladies vectorielles notamment les trypanosomoses africaines. Bien que la compréhension de l'interaction bactéries symbiotes-vecteur-parasite ne soit pas totalement claire surtout pour *Sodalis*, les résultats actuels permettent aux chercheurs de faire des propositions. Il a été démontré que *Wolbachia* protège *Drosophila melanogaster* contre l'infection à virus ARN (Teixeira et al. 2008) et limite l'infection des moustiques (*Aedes*, *Culex*) à certains virus tels que celui de la Dengue (Hoffmann et al. 2011; Walker et al. 2011; Nguyen et al. 2015), du Chikungunya (Mousson et al. 2010; Blagrove et al. 2013) et du West Nile (Glaser and Meola 2010) et à des nématodes filaires (Kambris et al. 2009). Ces résultats laissent croire à une possibilité d'utilisation de cette même stratégie avec les mouches tsé-tsé pour contrôler d'une part l'infection du virus de l'hypertrophie de la glande salivaire qui compromet l'élevage en masse dans les colonies, notamment avec *G. pallidipes* (Abd-Alla et al. 2010), et d'autre part le développement de mouches réfractaires à l'infection des trypanosomes. Dans le cadre de la lutte intégrée par l'utilisation de la technique autocide c'est la technique de l'insecte incompatible (TII) qui sera utilisée en lieu et place de la technique de l'insecte stérile (Van Den Abbeele et al. 2013), d'autant plus qu'avec *G. morsitans* un niveau élevé d'incompatibilité cytoplasmique a déjà été observé (Alam et al. 2011). Des mâles infectés à *Wolbachia*, joueraient le même rôle de détérioration de la population sauvage que les mâles stérilisés par irradiation. De plus, l'implication de *Wigglesworthia* dans la capacité vectorielle de son hôte vecteur est exploitable.

Chapitre II : Transport à longue distance de pupes matures de glossines

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Pagabeleguem et al. 2015) et d'une fiche technique publiée en annexe de cet article. Nous reviendrons brièvement sur le contexte de cette étude, la méthodologie appliquée et les principaux résultats obtenus.

2.1. Etude

Les Chefs d'Etats et de Gouvernements africains ont décidé en 2000 de redoubler d'efforts pour lutter contre les mouches tsé-tsé et les trypanosomoses en créant la Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC) (Kabayo 2002). Cette ambition conjointe d'éradiquer les glossines du continent sous-entend l'adoption d'une approche intégrée (AW-IPM) avec l'utilisation de la TIS. Pour faciliter son application, deux insectariums ont été construits, un au Burkina Faso pour l'Afrique de l'Ouest et l'autre en Ethiopie pour l'Afrique de l'Est, chacun ayant la capacité de produire 1 000 000 de mâles stériles par semaine. Ces deux unités de production doivent satisfaire les besoins en mâles stériles pour les futurs programmes de la sous-région, ce qui nécessitera le transport de pupes matures irradiées du pays producteur vers les pays demandeurs. Cependant, mettre en place un programme d'éradication de glossines à partir de pupes matures irradiées transportées sur une longue distance est une pratique nouvelle et le cas du programme d'éradication en cours au Sénégal en est le premier exemple. En effet, dans le cadre de la PATTEC, le gouvernement sénégalais a initié un programme d'éradication des glossines dans la zone des Niayes à partir d'une souche de *G. p. gambiensis* originaire du Burkina Faso en élevage à l'insectarium du Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zones Subhumides (CIRDES) à Bobo-Dioulasso. L'objectif de cette étude était de mettre en place un dispositif de transport de pupes matures irradiées et d'analyser l'effet de différents paramètres au cours du transport sur le rendement en mâles stériles disponibles pour la TIS.

A l'insectarium du CIRDES, les émergences des pupes mâles de quatre semaines d'âge environ étaient bloquées par le froid (8-10°C) puis irradiées au Césium ^{137}Ce à la dose de 110 Gy pendant 24 minutes et 30 secondes. Les pupes étaient ensuite placées dans des boîtes de pétri puis conditionnées dans des boîtes isothermes contenant des packs S8 ou PCM (Phase Change Material) pour maintenir la température au cours du transport autour de 10°C (cf. la fiche technique plus bas pour le détail). A la fermeture du colis, un enregistreur de données (hobo[®]) était introduit pour enregistrer la température et l'humidité relative au cours du transport. Les

pupes étaient transportées par bus de Bobo-Dioulasso à Ouagadougou puis acheminées par avion de Ouagadougou à Dakar. Le transport durait en moyenne 36 heures. Les pupes étaient envoyées une fois par semaine et chaque envoi était constitué de 2 lots de pupes. Les pupes du lot 1 étaient bloquées au froid (8-10°C) un jour de plus que celles du lot 2. Une fois à l'insectarium de Dakar, les pupes étaient mises à 25°C et 75% HR et après émergence, les mouches étaient triées pour séparer les femelles (accidentellement incluses dans les pupes envoyées) et les mouches avec les ailes non déployées des mâles normaux qui étaient gardés pendant 3-6 jours et alimentés avec du sang additionné de trypanocides avant d'être lâchés sur le terrain. Les mortalités étaient contrôlées quotidiennement.

Les résultats ont montré que le système de transport composé d'une boîte isotherme et des packs S8 permet de maintenir la température à $10,1 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ et l'humidité relative à $81,4 \pm 8,7\%$, conditions permettant d'éviter les émergences au cours du transport. Les pupes du lot 2 (gardées à 8-10°C un jour de moins que le lot 1) étaient de meilleure qualité que celles du lot 1 : un pourcentage d'émergence de $76,1 \pm 13,2$ contre $72,2 \pm 14,3\%$ pour le lot 1, un taux de mouches avec des ailes déformées de $10,7 \pm 7,5$ contre $12,0 \pm 6,3\%$ pour le lot 1 et un pourcentage de mâles stériles (par rapport au total de pupes reçues) disponibles pour les lâchers de $65,8 \pm 13,3$ contre $61,7 \pm 14,7\%$ pour le lot 1.

La méthodologie et les résultats sont détaillés dans l'article :

Pagabeleguem S., Seck M.T., Sall B., Vreysen M.J.B., Gimonneau G., Fall A.G., Bassene M.D., Sidibé I., Rayaissé J.B., Belem A.M.G. and Bouyer J. (2015). Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield. *Parasites & Vectors* 8, 259.

RESEARCH

Open Access

Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield

Soumaïla Pagabeleguem^{1,2,3*}, Momar Talla Seck⁴, Baba Sall⁵, Marc JB Vreysen⁶, Geoffrey Gimonneau^{2,3,4}, Assane Gueye Fall⁴, Mireille Bassene⁴, Issa Sidibé^{1,7}, Jean-Baptiste Rayaïssé⁷, Adrien MG Belem⁸ and Jérémy Bouyer^{2,3,4,9}

Abstract

Background: The application of the sterile insect technique (SIT) requires mass-production of sterile males of good biological quality. The size of the project area will in most cases determine whether it is more cost effective to produce the sterile flies locally (and invest in a mass-rearing facility) or import the sterile flies from a mass-rearing facility that is located in another country. This study aimed at assessing the effect of long distance transport of sterile male *Glossina palpalis gambiensis* pupae on adult male fly yield.

Methods: The male pupae were produced at the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, and shipped with a commercial courier service in insulated transport boxes at a temperature of $\pm 10^{\circ}\text{C}$ to Senegal (± 36 h of transport). Upon arrival in the insectary in Dakar, the pupae were transferred to an emergence room and the flies monitored for 3–6 days.

Results: The results showed that the used system of isothermal boxes that contained phase change material packs (S8) managed to keep the temperature at around 10°C which prevented male fly emergence during transport. The emergence rate was significantly higher for pupae from batch 2 (chilled at 4°C for one day in the source insectary before transport) than those from batch 1 (chilled at 4°C for two days in the source insectary before transport) i.e. an average (\pm sd) of $76.1 \pm 13.2\%$ and $72.2 \pm 14.3\%$, respectively with a small proportion emerging during transport ($0.7 \pm 1.7\%$ and $0.9 \pm 2.9\%$, respectively). Among the emerged flies, the percentage with deformed (not fully expanded) wings was significantly higher for flies from batch 1 ($12.0 \pm 6.3\%$) than from batch 2 ($10.7 \pm 7.5\%$). The amount of sterile males available for release as a proportion of the total pupae shipped was $65.8 \pm 13.3\%$ and $61.7 \pm 14.7\%$ for batch 1 and 2 pupae, respectively.

Conclusions: The results also showed that the temperature inside the parcel must be controlled around 10°C with a maximal deviation of 3°C to maximize the male yield.

Keywords: Area-wide integrated pest management, Sterile insect technique, Pupae development, Low temperatures, Pupae transport, Mass-rearing, Diptera, Glossinidae

* Correspondence: pagasoum@yahoo.fr

¹Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign, Bobo-Dioulasso 01 BP 1087, Burkina Faso

²Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, Montpellier 34398, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The western region of Senegal called Niayes is characterized by specific climatic and ecological conditions with good potential for keeping exotic cattle for milk and meat production. Most of the intensive milk production systems of suburban Senegal that keep mainly exotic cattle breeds such as Montbeliard, Jersiaise, Holstein and Girare found in this area [1,2]. This area is also infested with the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank (Diptera: Glossinidae) which is the main vector of *Trypanosoma vivax* and *T. congolense* [3], parasites that cause the debilitating disease African Animal Trypanosomosis (AAT) in livestock [4]. In Senegal, the livestock sector is far from satisfying national milk and meat needs and depends on imported products that represent double the national production to meet the demand [2]. The Government of Senegal is making efforts to maximize the potential of this region by stimulating programs that aim at improving animal productivity as to meet the growing internal demand in animal products, improve food and nutrition security and reduce the cost of milk imports due to the presence of trypanosomosis [5-7].

In 2000, the African Heads of State and Government decided to increase efforts to address the tsetse and trypanosomosis problem on the African continent and created the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC) [8]. In this context, the Government of Senegal initiated in 2005 a program called "Projet d'éradication des mouches tsé-tsé dans les Niayes" [3]. This initiative has been technically and financially supported by the Government of Senegal, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the International Atomic Energy Agency (IAEA), the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), and the United States State Department under the Peaceful Uses Initiative (PUI). Results from the baseline data collection and the feasibility studies in the Niayes have indicated that *G. p. gambiensis* was the only tsetse species present [5] and that the various populations were genetically isolated from the nearest population in Missira located >200 km to the south-east [9]. In addition, studies carried out in walk-in field cages showed that a Burkina Faso strain of *G. p. gambiensis* was sexually compatible with the populations inhabiting the Niayes [10]. The results of these studies prompted the project stakeholders in 2011 to develop and implement a strategy of eradication following area-wide integrated pest management (AW-IPM) principles whereby several tsetse control tactics would be combined with the sterile insect technique (SIT) [5,11].

Partnerships have been developed with international organizations such as the FAO, the IAEA and the Centre International de Recherche-Développement Sur l'Élevage en Zone Subhumide (CIRDES) and national institute

such as the CIRAD. In this context, an agreement was made with the CIRDES in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso to mass-produce the Burkina Faso (BKF) strain of *G. p. gambiensis* to supply the sterile males needed for the SIT component of the AW-IPM program in Senegal. This required the long distance transport of male pupae from Bobo-Dioulasso to Dakar via Ouagadougou (2100 km) which could affect the competitiveness of the male flies and the success of the eradication program.

The aim of this work was to assess the effectiveness of the developed pupal transport methods from the source insectary in Bobo-Dioulasso to Dakar and to assess the effect of transport on the number of sterile males available for the SIT component of the programme.

Methods

Insectary

The study was carried out in an insectary at the Institut Sénégalais de Recherche Agricoles, Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service Bio-Écologies et de Pathologies Parasitaires (ISRA/LNERV/BEPP) in Dakar. The insectary was equipped to receive and incubate the pupae, to monitor their emergence, and to assess total available sterile male flies and their quality. In the insectary, the flies were maintained at 24-25°C, 75-80% RH, and a photoperiod of 12:12 h (L:D).

Biological material

Pupae of the *G. p. gambiensis* BKF strain were used in this study. This tsetse colony has been maintained at the CIRDES insectary for more than 40 years and feeding is done using in vitro silicon membrane system using irradiated cow blood that is collected from the local abattoir [12]. The colony was established in 1972 at Maison-Alfort (France) with pupae collected from Guinguette (Bobo-Dioulasso) and in 1975 the colony was transferred to the Centre de Recherche sur la Trypanosomiase Animale (CRTA) (renamed later CIRDES). In 1981 the colony was supplemented with wild material from the "Marreaux hippopotames" [10]. Based upon research carried out at the Insect Pest Control Laboratory (IPCL) [13], a protocol was developed that enabled the shipment of sterile male pupae while retaining the majority of the female flies for colony maintenance. Female tsetse flies emerge before the males [14] and as soon as most of the females had emerged (indicated by the first emergences of males) the remaining pupae were chilled to 4°C to prevent male fly emergence. Ninety percent of pupae were 29 days (29 ± 1) of age when chilling started.

Packaging and transport of pupae

At the CIRDES insectary, pupae were collected weekly on Wednesday (batch 1) and Thursday (batch 2) from January 2011 to July 2013, and on Sunday (batch 1) and

Monday (batch 2) from August 2013 to January 2014. Pupae were immediately chilled (4°C) after collection and irradiated under chilled conditions the following day with 110 Gy in a ^{137}Ce source for 24 min 30 seconds. Pupae were transported on Friday (January 2011 to July 2013) and on Tuesday (August 2013 to January 2014) with a courier service (DHL®) using public bus transport from Bobo-Dioulasso to Ouagadougou and commercial aircraft between Ouagadougou and Dakar.

The irradiated pupae were placed in petri dishes at 8–10°C and packed in insulated boxes containing phase change material packs (S8) (PCM Phase Change Material Products limited, Cambridgeshire, United Kingdom) to maintain the temperature around 10°C (see additional file for a detailed description of the packaging protocol). The average transport and chilling time for pupae from batch 1 and 2 was 84 ± 9 and 60 ± 12 hours, respectively i.e. 48 ± 7 and 24 ± 10 hours at 4°C in the source insectary and ± 36 hours at $\pm 10^\circ\text{C}$ for transport to Dakar. The box size and the number of S8 packs used were adjusted to the number of pupae shipped. As an example six S8 packs were used for a shipment of 3000 pupae in a box with an internal size of 15x17x19cm. The transport box was accompanied by a document indicating the number and age of the shipped pupae, time of chilling, irradiation dates, irradiation duration and dose. The data obtained from the sheet was used for monitoring the quality of the pupae on arrival at the ISRA insectary.

Emergence and monitoring of flies at the insectary

The study was implemented from January 2011 to January 2014. At the insectary in Dakar, the pupae of each shipment were placed in Petri dishes and covered with ~1 cm of autoclaved sand mixed with a fluorescent dye (DayGlo®) (0.5 g dye / 200 g of sand) to mimic natural emergence conditions and to allow discrimination with wild flies in the monitoring traps (as these sterile male flies were also used for sterile male release trials and operational releases). Emerged flies of each shipment were chilled between 2 and 4°C every 24 hours and sorted by sex to remove the females that were accidentally included in the shipments. Flies with deformed wings were discarded and “normal” males were kept in standard fly holding cages (20 cm diameter and 7 cm height) at a density of 120 males per cage and offered a blood meal every morning for 3–6 days using an in vitro silicon membrane feeding system [15]. For each liter of blood used for feeding, 10 mg of the trypanocidal drug isometamidium [16,17] was added to prevent the cyclical development of trypanosomes in the released sterile males.

Records were kept of daily mortality of the male flies and of the numbers of flies with deformed wings that had emerged during transport and at the insectary at ISRA. The emergence rate of pupae was calculated as

the ratio of the number of flies emerged to the number of pupae received. The percentage of females was calculated in order to have the exact number of male pupae sent. The yield of sterile males of each shipment usable for the releases (i.e. available sterile males) was estimated as the ratio of the usable males to the number of pupae received.

Temperature and relative humidity records during transport

Temperature and relative humidity inside the insulated box were recorded with a Hobo® data logger for each shipment. It was added to the shipping box during the packaging at the CIRDES. The Hobo® was programmed to record data every 5 minutes. After arrival at the ISRA insectary, temperature and relative humidity data recorded during transport were downloaded from the Hobo® with the HOBOware Software (see example Figure 1).

Data analysis

The adult emergence rate, sterile male mortality rate in the insectary before release, percentage of flies that had emerged with deformed wings, percentage of females and percentage of available sterile males for release were analyzed using binomial mixed effects models. The shipment date was used as a random effect, whereas the batches (batch 1 chilled (4°C) one day longer than batch 2) and the climatic variables (temperature and relative humidity) and their interaction were used as fixed effects. The best model was selected on the basis of the lowest corrected Akaike information criterion (AICc), and the significance of fixed effects was tested using the likelihood test ratio [18,19]. The R (version 2.15.0) Software was used for data analysis [20].

Ethical statement

The study was conducted in the framework of the tsetse control program in Senegal, led by the Direction of Veterinary Services, Ministry of livestock. This project received official approval from the Ministry of Environment of Senegal, under the permit N°0874/MEPN/DE/DEIE/mbf.

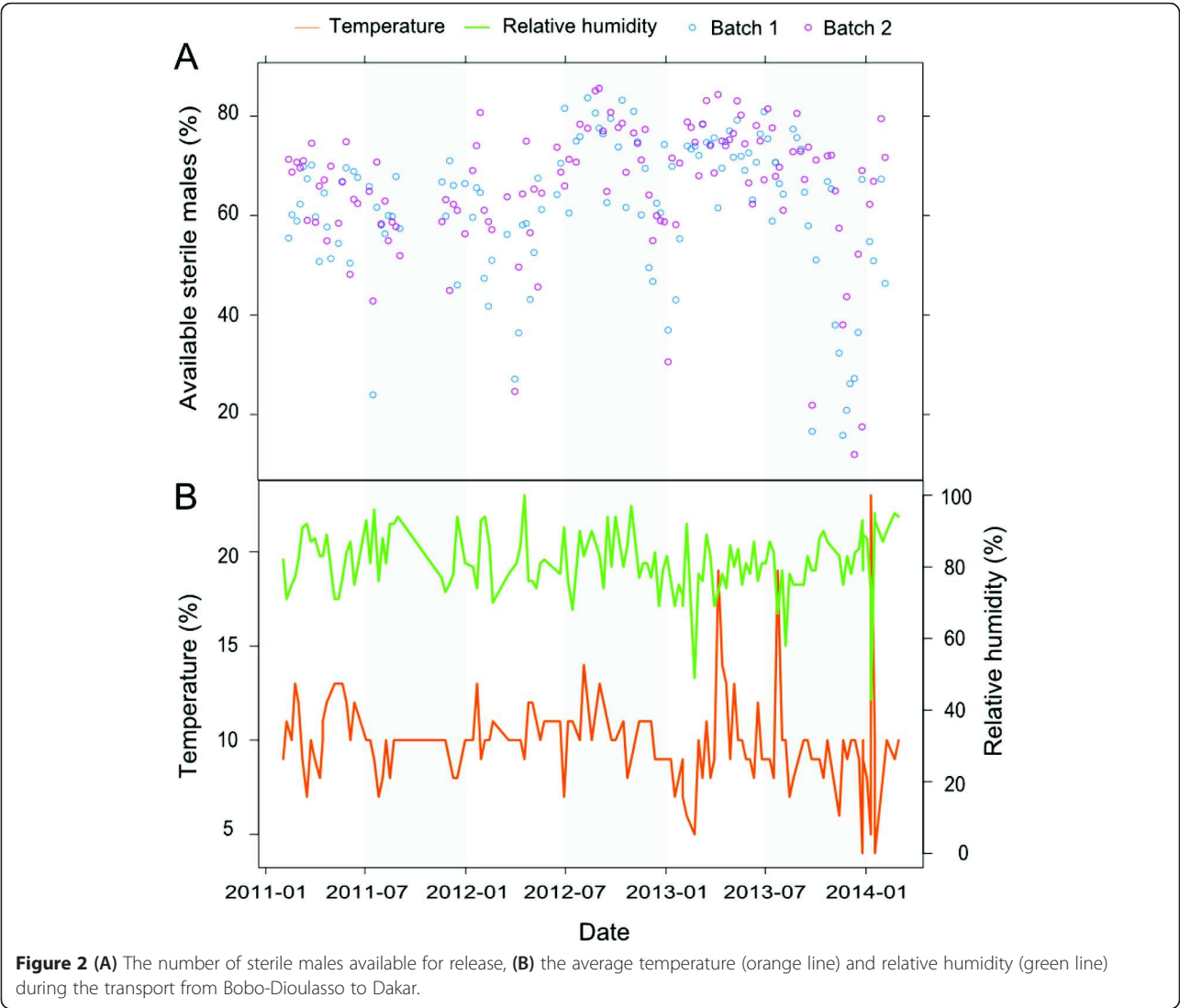
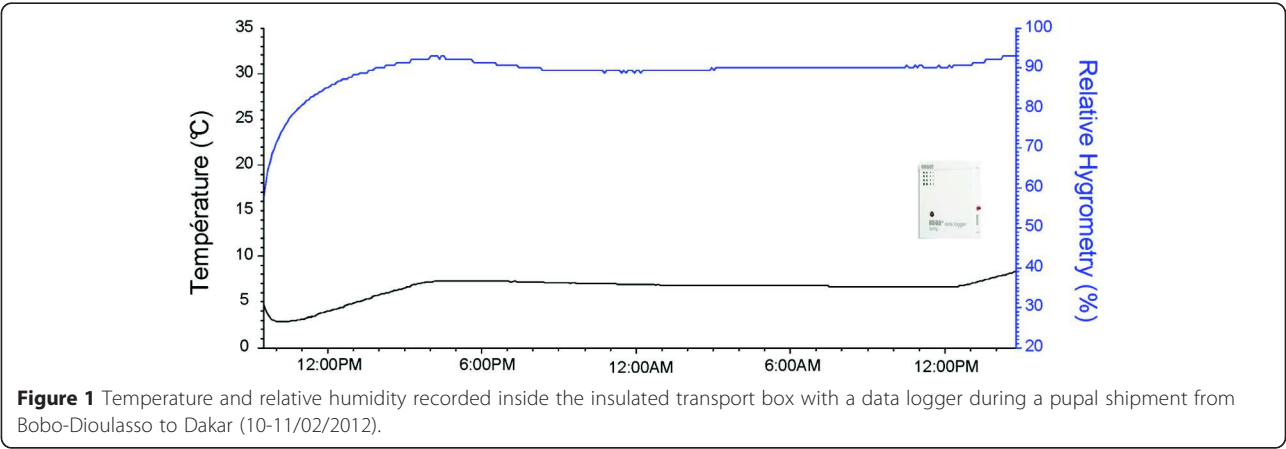
Results

Temperature and relative humidity during transport of pupae

The average temperature (\pm sd) inside the insulated transport box of shipments from CIRDES over three years was $10.1 \pm 2.3^\circ\text{C}$ (Figure 2) but peaks up to 20°C were recorded. The relative humidity of 92% shipments ranged between 70 and 95% (Figure 2), averaging (\pm sd) $81.4 \pm 8.7\%$.

Emergence during transport

In 55% of shipments, fly emergence was observed during transport. Average fly emergence during transport was



significantly higher for batch 1 pupae as compared with batch 2 pupae ($P < 10^{-3}$; Table 1). The number of emerging flies increased with increasing temperatures and relative humidity inside the transport box ($P < 10^{-3}$), showing that high temperatures stimulated emergence (Figure 3A). The interaction between temperature and relative humidity did not influence ($P = 0.09$) fly emergence during transport.

Emergence of pupae at ISRA insectary

A total of 912,715 irradiated pupae were received in 132 shipments at the ISRA insectary (Dakar) from January 2011 to January 2014. Adult emergence was significantly higher for batch 2 pupae compared with pupae from batch 1 ($P < 10^{-3}$; Table 1). Adult fly emergence at the ISRA insectary decreased with increasing temperatures and relative humidity during transport inside the insulated transport box ($P < 10^{-3}$), showing that high temperatures were detrimental for adult emergence (Figure 3B). The interaction between temperature and relative humidity was not significant ($P = 0.22$). The frequency distribution of emerged flies by gender showed a small proportion (\pm sd) of females ($3.3 \pm 4.0\%$), which were systematically discarded because they have no useful role in the SIT for tsetse flies. The proportion of emerged male flies with deformed wings was statistically higher for batch 1 pupae compared with batch 2 pupae ($P < 10^{-3}$; Table 1). The number of males emerging with deformed wings decreased with increasing temperatures and relative humidity inside the transport box ($P < 10^{-3}$) but the correlation was not linear (Figure 3C). Their interaction had a positive effect ($P < 10^{-3}$), showing that high temperatures and relative humidity were also detrimental.

Survival of sterile males

After emergence, sterile male survival was monitored in the insectary for three to six days before being released in the field. The mortality rate of the sterile male flies was similar between batches ($P = 0.43$; Table 1). The climatic conditions during transport impacted survival of the male flies at the insectary: higher temperature and relative humidity during transport reduced survival after emergence ($P < 10^{-3}$).

Available sterile males for release

Taking into account the proportion of females, male flies with deformed wings, flies emerged during transport

and the mortality rate in the insectary before release, the remaining sterile male flies (i.e. the male yield) were considered as available for release in the field for the eradication program. The average adult male yield was significantly higher for pupae from batch 2 than those from batch 1 ($P < 10^{-3}$; Table 1). The temporal sterile male yield over the three years is shown in Figure 2. Any increase of temperature above the 10°C threshold during transport resulted in adult flies emergence during transport and higher mortality rates during the maintenance period at the insectary or a higher proportion of male flies with deformed wings. Temperatures below the 10°C threshold increased the proportion of male flies with deformed wings. Temperatures outside the $7\text{--}13^{\circ}\text{C}$ range reduced the percentage of sterile males available for release. The impact of this variable was relatively linear up to 13°C (Figure 3D). The impact of humidity on the production of sterile males was not linear but bell-shaped in the range 75–95% (Figure 3D). All variation outside this range during transport was prejudicial to the flies. The significant interaction between temperature and relative humidity ($P < 10^{-3}$) and the positive correlation between temperature and the percentage of available males showed that the negative effects of high temperatures on the proportion of operational males were offset by a higher relative humidity.

Discussion

The tsetse eradication programme in the Niayes of Senegal adopted a novel approach for the SIT component i.e. the sterile flies used for the releases in the Niayes to eradicate the native *G. p. gambiensis* populations originated from a strain that was originally collected and mass-reared in a different country. The mature male pupae were irradiated and transported under chilling conditions to Senegal. To our knowledge this is the first time that such approach is implemented in tsetse eradication programme. In other SIT research projects, tsetse were transported as irradiated adults. Indeed, *G. tachinoides* adult males were reared at Maisons-Alfort and irradiated at Saclay (France), then transported by air to N'Djamena (Chad) to be release in low Logone (Cameroon) [21,22]. Whereas the transboundary shipment of mature irradiated pupae is applied for the first time in a tsetse eradication program with an SIT component, it is common practice for other pests such as fruit flies [23–25]. Under the umbrella of the PATTEC that calls

Table 1 Effect of batch on flies emergences parameters (average \pm sd)

| Batch | Comparison parameters | | | | |
|-------|----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Emergence during transport | Emergence in insectary | Emerged male with deformed wings | Mortality in insectary | Available sterile males |
| 1 | 0.9 ± 2.9^a | 72.2 ± 14.3^a | 12.0 ± 6.3^a | 5.9 ± 6.3^a | 61.7 ± 14.7^a |
| 2 | 0.7 ± 1.7^b | 76.1 ± 13.2^b | 10.7 ± 7.5^b | 5.8 ± 6.0^b | 65.8 ± 13.3^b |

The data on the same column with a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

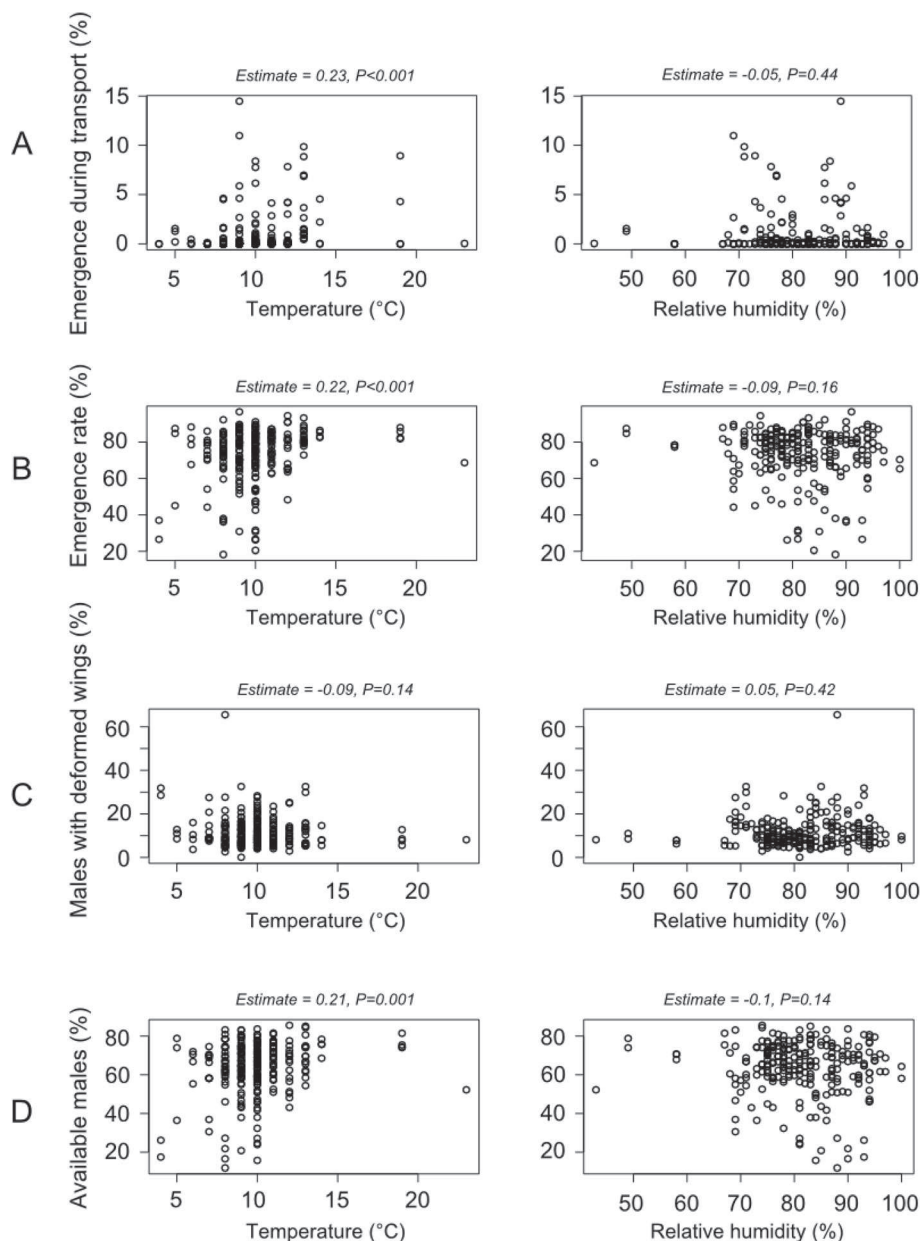


Figure 3 Correlation between the temperature and relative humidity during transport and entomological parameters. The values of the estimates and associated *P*-values correspond to the fix effects of the best mixed model for the corresponding response variable.

for increased efforts of the African Heads of State and Government to better manage the tsetse fly and trypanosomiasis problem, the Government of Senegal selected an AW-IPM eradication approach that included the SIT [26–28] as it is considered very efficient in eradicating riverine species [29]. To facilitate the implementation of the SIT component of the PATTEC initiative, two tsetse mass-rearing facilities were constructed, one located in West Africa (Burkina Faso) and the other one located in East Africa (Ethiopia), each having the projected capacity to produce one million sterile male tsetse per week (*G. p. gambiensis* in Burkina

Faso and *G. pallidipes* in Ethiopia). Although the focus for both facilities is on their national tsetse programs, they might also be considered to produce sterile male flies for other potential programs that include an SIT component in the sub-region. This would require transport of pupae or adults (although these latter are more fragile for transport) of the target species from the mass-rearing facility to the requesting country. The long-distance transport of sterile male *G. p. gambiensis* pupae from Burkina Faso to Senegal over a period of three years in support of the eradication programme in the Niayes provided much insight on the

effect of various parameters during the transport on the yield and quality of available sterile males for the SIT component of the campaign.

Based upon data from research carried out at the IPCL in Austria in support of the eradication campaign in the Niayes [30], a handling and transport protocol was proposed that took advantage of the differential development time of female and male pupae in combination with low temperatures. A temperature of $\pm 10^{\circ}\text{C}$ and RH of $>75\%$ was selected to transport the male pupae, in view that temperatures below 12°C prevent emergence of adult tsetse flies [31,32]. The chilled male pupae were transported in an insulated box that contained S8 phase change packs that maintained the temperature inside the box at around 10°C for the entire shipping period. Despite the delay in receiving some shipments usually due to technical reasons such as flight cancellation, the environmental conditions inside the parcel were maintained relatively stable for at least 72 hours.

The emergence rate of pupae received at the ISRA (average $74.2 \pm 13.9\%$) was lower than what was observed at the source insectary in the CIRDES (between 90 to 95%, unpublished data). This difference might be related to vibrations or mechanical shocks during transport in addition to the stress due to the chilling, handling and irradiation of the pupae (tsetse pupae are specially sensitive the last days before adult emergence [32]), or to the effect of fluctuating temperature and/or humidity conditions during transport, or a combination of these factors. Although Vreysen *et al.* (1996) showed that treating 4–6 days old adult male *G. tachinoides*, *G. f. fuscipes* and *G. brevipalpis* decreased their average lifespan [33], Vreysen (1995) showed that irradiation of *G. tachinoides* pupae on day 25 or 28 post larviposition with doses up to 120 Gy did not negatively impact fly emergence [34]. Mutika *et al.* 2014 showed that emergence rate of *G. p. gambiensis* pupae that were chilled for 5 days and irradiated with 110 Gy during the first 24 h of cooling, had emergence rates between 76 to 91% [30]. Our data indicate that keeping the pupae at 10°C for two or three days did not negatively influence adult emergence rates. These results are in line with previous data showing that pupae of *G. p. gambiensis* stored at 10°C and 12.5°C for 3, 5 and 7 days [30], pupae of *G. morsitans* maintained at 12°C for 2 weeks [31], pupae of *G. pallidipes* stored at 15°C for 72 hours [13], pupae of *Haematobia irritans* Linnaeus kept at 4°C for up to 2 weeks [35] and pupae of *Cydia pomonella* kept at -0.16 to 0.61°C during transport from Canada to South Africa [36] had emergence rates that indicated no significant detrimental effect of the low temperatures.

The percentage of females flies was very low in the various consignments confirming the effectiveness of the method used at the source insectary to obtain only male pupae, namely by preventing emergence through cooling

of the pupae when most of the female flies had emerged and the first males started emerging [37]. With this method it is possible to retain $>97\%$ of the female flies for colony production, which is essential for mass-rearing tsetse flies that have a very slow reproductive rate.

Between 10–12% of the male flies that emerged at the ISRA insectary had deformed wings. This anomaly was not observed at the CIRDES insectary (unpublished data). The same abnormalities were also reported with *G. tachinoides* males which were irradiated in France and airlifted to Chad for experimental releases [21]. It is postulated that these abnormalities could be correlated with variation of the temperature and relative humidity during transport and/or might also be related to vibrations or mechanical shocks during transport: this will require further research. During previous studies, a temperature below 16°C immobilized adults and did not allow the pre-imagoes to undergo normal development to reach the adult stage [32]. Accordingly, all the flies that emerged during transport had deformed wings in our study.

Mortality of sterile male flies at the ISRA insectary could be related either to handling stress or contamination of the blood as some flies died with their abdomen filled with blood. Deaths due to blood feeding could be caused by drugs administered to animals before slaughtering [38], or even by fluctuation of the blood temperature outside the optimal $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ range during feeding [39]. The influence of temperature and relative humidity inside the insulated transport boxes on the survival of the emerged male flies in the insectary before release might be due to a depletion of fat reserves with higher temperatures.

Taking into account the number of the male flies emerged with deformed wings, that died in the ISRA insectary before release and the proportion of female flies in the consignments, the used handling and transport protocol gave a sterile male yield of $63.7 \pm 14.1\%$ as a proportion of the total pupae received. Performance of adults emerging from batch 1 pupae (chilled one day longer at 4°C) was significantly lower than those of batch 2 pupae, showing that the duration of chilling at 4°C had a negative impact. These available males (63.7%) were used to implement the operational release phase of the eradication project with very good results [40]. One of the key factors that determine the success of an AW-IPM program with an SIT component is the competitiveness of the released sterile males [41–43], and therefore, efforts are ongoing to further improve the transport conditions. The competitiveness of the released sterile male flies after release in the target zone is presently under evaluation in Senegal.

Conclusions

This study confirms the feasibility of transporting chilled, irradiated male *G. p. gambiensis* pupae over long distances

within a period of three days and also the available emerging adult male flies for the release phase of an eradication campaign with a SIT component. These results of the developed handling and transport protocol were very encouraging and have contributed to the success of the ongoing eradication phase in Senegal so far. The data collected will also be useful for future programs that will adopt the same approach.

Additional file

Additional file 1: Mature sterile male pupae packaging protocol.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Designed the study: SP, JB, MTS, BS, AGF, MJBV. Conducted the experiments: SP, MTS, AGF, JB. Analyzed the results: SP, JB. Drafted and edited the manuscript: SP, JB, MTS, MJBV, BS, GG, AGF, MB, IS, JBR, AMGB. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The work presented in this article was supported by the Government of Senegal, the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, the Department of Technical Cooperation of the IAEA, the CIRAD (Project "Integrated Vector Management: innovating to improve control and reduce environmental impacts" of Institut Carnot Santé Animale (ICSA) excellence network) and the US State Department. We thank the Managers and Technicians of CIRDES insectary for their cooperation. We also thank Thomas Balenghien for his help in data analysis and SCAC of the Embassy of France in Burkina Faso for the scholarship. Authors also thank the reviewers for their useful comments and suggestions on the paper.

Author details

¹Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign, Bobo-Dioulasso 01 BP 1087, Burkina Faso. ²Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, Montpellier 34398, France. ³Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1309 'Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes', Montpellier 34398, France. ⁴Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service de Parasitologie, Dakar - Hann, BP 2057, Sénégal. ⁵Direction des Services Vétérinaires, 37, avenue Pasteur, Dakar BP 67, Sénégal. ⁶Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Wagramer-strasse 5, PO Box 100, Vienna A-1400, Austria. ⁷Centre International de Recherche-développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, Bobo-Dioulasso 01 BP 454, Burkina Faso. ⁸Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Houet, BP 1091, Burkina Faso. ⁹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Mixte de Recherche 'Interactions hôtes-vecteurs-parasites-environnement dans les maladies tropicales négligées dues aux trypanosomatides', Montpellier 34398, France.

Received: 18 March 2015 Accepted: 21 April 2015

Published online: 01 May 2015

References

- Broutin C, Sokona K, Tandia A. Paysage Des Entreprises et Environnement de La Filière Lait Au Sénégal, Programme Inco "MPE Agroalimentaires". Dakar, Sénégal: GREP; 2000. p. 57.
- Duteurtre V. Etat Des Lieux de La Filière Lait et Produits Laitiers Au Sénégal. Dakar, Sénégal: InfoConseil MPEA/PAOA; 2006. p. 98.
- Seck MT, Bouyer J, Sall B, Bengaly Z, Vreysen MJB. The prevalence of African animal trypanosomoses and tsetse presence in Western Senegal. *Parasite*. 2010;17:257–65.
- Itard I, Cuisance D, Tacher G. Trypanosomoses: historique: répartition géographique. In Lefèvre PC, Blancou J, and Chermette R, dir. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et Région Chaudes. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc; 2003:1607–1615.
- Bouyer J, Seck MT, Sall B, Ndiaye EY, Guerrini L, Vreysen MJB. Stratified entomological sampling in preparation for an area-wide integrated pest management program: the example of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the niayes of Senegal. *J Med Entomol*. 2010;47:543–52.
- Bouyer F, Seck MT, Dicko AH, Sall B, Lo M, Vreysen MJB, et al. Ex-ante benefit-cost analysis of the elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* population in the niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8, e3112.
- Touré SM. Lutte contre *Glossina palpalis gambiensis* dans la région des niayes du Sénégal. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1973;26:339–47.
- Kabayo JP. Aiming to eliminate tsetse from Africa. *Trends Parasitol*. 2002;18:473–5.
- Solano P, Kaba D, Ravel S, Dyer NA, Sall B, Vreysen MJB, et al. Population genetics as a tool to select tsetse control strategies: suppression or eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e692.
- Mutika GN, Kabore I, Seck MT, Sall B, Bouyer J, Parker AG, et al. Mating performance of *Glossina palpalis gambiensis* strains from Burkina Faso, Mali, and Senegal. *Entomol Exp Appl*. 2013;146:177–85.
- Klassen W. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J, Joint FAO/IAEA Programme, editors. Area-wide control of insect pests. Vienna, Austria: Springer Netherlands; 2005. p. 39–68.
- Bauer B, Filledier J, Kabore I. Large scale rearing of tsetse flies (Diptera, Glossinidae) in the C.R.T.A. Bobo-Dioulasso, Burkina based on in vitro feeding techniques. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1984;37:9–17.
- Mutika GN, Opiyo E, Robinson AS. Effect of Low temperature treatment on the quality male adult *Glossina pallidipes* (Diptera: glossinidae) relation to the sterile insect technique. *Entomol Sci*. 2002;5:209–14.
- Itard I, Bauer B. Élevage des glossines: synthèse. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1984;37:143–75.
- Bauer B, Wetzel H. A new membrane for feeding *Glossina morsitans* Westw. (Diptera, Glossinidae). *Bull Entomol Res*. 1976;65:563.
- Moloo SK, Kamunya GW. Suppressive action of Samorin on the cyclical development of pathogenic trypanosomes in *Glossina morsitans centralis*. *Med Vet Entomol*. 1987;1:285–7.
- Van Den Bossche P, Akoda K, Djagmah B, Marcotty T, De Deken R, Kubi C, et al. Effect of isometamidium chloride treatment on susceptibility of tsetse flies (Diptera: glossinidae) to trypanosome infections. *J Med Entomol*. 2006;43:564–7.
- Burnham KP, Anderson DR. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2nd ed. New-York: Springer; 2002.
- Hurvich CM, Tsai C-L. Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*. 1995;51:1077.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2013.
- Cuisance D, Itard I. Comportement de mâles stériles de *Glossina tachinoides* West. lâchés dans les conditions naturelles aux environs de Fort-Lamy (Tchad): Transport, lâchers, rythme d'activité, action sur la population sauvage. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1973;26:55–76.
- Cuisance D, Itard J. Releasing of sterile *Glossina tachinoides* West. males in a natural, low density setting (low Logone, Comeroon). *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1973;26:405–22.
- Enkerlin W, Quinlan MM. Development of an international standard to facilitate the transboundary shipment of sterile insects. In: Barnes BN, editor. Proceedings, Symposium: 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 6–10 May 2002, Stellenbosch, South Africa. Irene, South Africa: Isteg Scientific Publications; 2004. p. 203–12.
- Kakinohana H, Kuba H, Kohama T, Kinjo K, Taniguchi M, Nakamori H, et al. Eradication of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett, by Mass Release of Sterile Flies in Okinawa Prefecture, Japan. *JARQ*. 1997;2:91–100.
- Vargas-Teran M, Hursay BS, Cunningham EP. Eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitol Today*. 1994;10:119–22.

26. Politzar H, Cuisance D. An integrated campaign against riverine tsetse flies *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Sci Appl.* 1984;5:439–42.
27. Takken V, Oladunmade MA, Dengwat L, Feldmann HU, Onah JA, Tenabe SO, et al. The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bull Entomol Res.* 1986;76:275–86.
28. Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu Z-R, Juma KG, et al. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *J Econ Entomol.* 2000;93:123–35.
29. Bouyer J, Seck MT, Sall B. Misleading guidance for decision making on tsetse eradication: Response to. *Prev Vet Med.* 2013;112:443–6.
30. Mutika GN, Kabore I, Parker AG, Vreysen MJB. Storage of male *Glossina palpalis gambiensis* pupae at low temperature: effect on emergence, mating and survival. *Parasites & Vectors.* 2014;7:465.
31. Birkenmeyer DR, Dame DA. Storage and sexual separation of *Glossina morsitans morsitans* Westwood puparia. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69:399–405.
32. Pollock JN. Training manual for tsetse control personnel: biology, systematics and distribution; techniques, vol. 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy; 1982.
33. Vreysen MJ, Van Der Vloedt AM, Barnor H. Comparative gamma-radiation sensitivity of *Glossina tachinoides* Westw., *Glossina fuscipes fuscipes* Newst. and *Glossina brevipalpis* Newst. (Diptera, Glossinidae). *Int J Radiat Biol.* 1996;69:67–74.
34. Vreysen MJB. Radiation induced sterility to control tsetse flies: the effect of ionising radiation and hybridisation on tsetse biology and the use of the sterile insect technique in integrated tsetse control. *Landbouwniversiteit*; 1995. p. 279.
35. Jones SR, Kunz SE. Effects of cold stress on survival and reproduction of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol.* 1998;35:725–31.
36. Blomefield T, Carpenter JE, Vreysen MJB. Quality of Mass-Reared Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) After Long-Distance Transportation: 1. Logistics of Shipping Procedures and Quality Parameters as Measured in the Laboratory. *J Econ Entomol.* 2011;104:814–22.
37. Opiyo E, Luger D, Robinson AS. New systems for the largescale production of male tsetse flies (Diptera: Glossinidae). In: Tan KH, editor. *Proceedings: Area-Wide control of fruit flies and other insect pests, and the 5th international symposium on fruit flies on economic importance, 28 may - 5 June 1998. Penang, Malaysia: Penerbit University Sains Malaysia; 2000. p. 337–44.*
38. Cuisance D, Sellin E, Taze Y, Politzar H. Effets sur *Glossina palpalis gambiensis* de substances médicamenteuses administrées au lapin hôte-nourricier. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1979;1:37–46.
39. Opiyo E, Parker AG, Mohammed AH. Standard operating procedures for mass rearing tsetse flies. Vienna, Austria: FAO/IAEA; 2006. p. 239.
40. Dicko AH, Lancelot R, Seck MT, Guerrini L, Sall B, Lo M, et al. Using species distribution models to optimize vector control in the framework of the tsetse eradication campaign in Senegal. *PNAS.* 2014;111:10149–54.
41. Vreysen MJ. Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Med Trop (Mars).* 2001;61:397–411.
42. Vreysen MJB, Seck MT, Sall B, Bouyer J. Tsetse flies: Their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *J Invertebr Pathol.* 2013;112:15–25.
43. Sow A, Sidibé I, Bengaly Z, Bancé AZ, Sawadogo GJ, Solano P, et al. Irradiated male tsetse from a 40-year-old colony are still competitive in a riparian forest in Burkina Faso. *PLoS One.* 2012;7, e37124.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional file

Mature sterile male pupae packaging protocol

The aim of this document is to present a standard packing and transport protocol of sterile male *Glossina palpalis gambiensis* pupae to stakeholders for tsetse area-wide integrated pest management programmes that include a sterile insect technique (SIT) component. Adherence to this protocol will prevent emergence of the male pupae inside the insulated box during transport, will reduce vibrations that have a negative impact on male fly quality and, will allow sufficient oxygenation of the pupae: strict adherence to the protocol will result in an optimal sterile male fly yield and in male flies with good sexual competitiveness.

First, to adequately oxygenate the pupae, and allow air to circulate between the petri dishes or cartons that contain the pupae, the amount of pupae should be adapted to the size of the petri dishes and the cartons.

We advise the following amounts of pupae:

- a maximum of 200 male *G. p. gambiensis* pupae for a petri dish with 5.4 cm diameter and 1.2 cm height (pierced with holes for air circulation)
- a maximum of 500 male *G. p. gambiensis* pupae for a petri dish with 8.8 cm diameter and 1.5 cm height (pierced with holes for air circulation)
- a maximum of 1500 male *G. p. gambiensis* pupae for a carton with a size of 12.4 x 8.2 x 2 cm (pierced with holes for air circulation).

Provisions should be made to reduce the vibrations and shocks received by the pupae during transport, i.e. a single layer of pupae should be placed on a layer of cotton and mosquito netting that are placed on the bottom of the petri dish or the carton, and covered by a second layer of cotton and mosquito netting (Figure 1). The carton or petri dish should be closed with adhesive tape taking care not to cover any aeration holes (Figure 1). The order of layers needs to be respected e.g. the second layer of cotton must be in direct contact with the pupae in order to prevent their accumulation on one side of the box should the transport box not be placed upright during transport. Enough cotton should be placed in the petri dish or cartons so that a small pressure is exerted on the pupae that will stabilize them during transport.

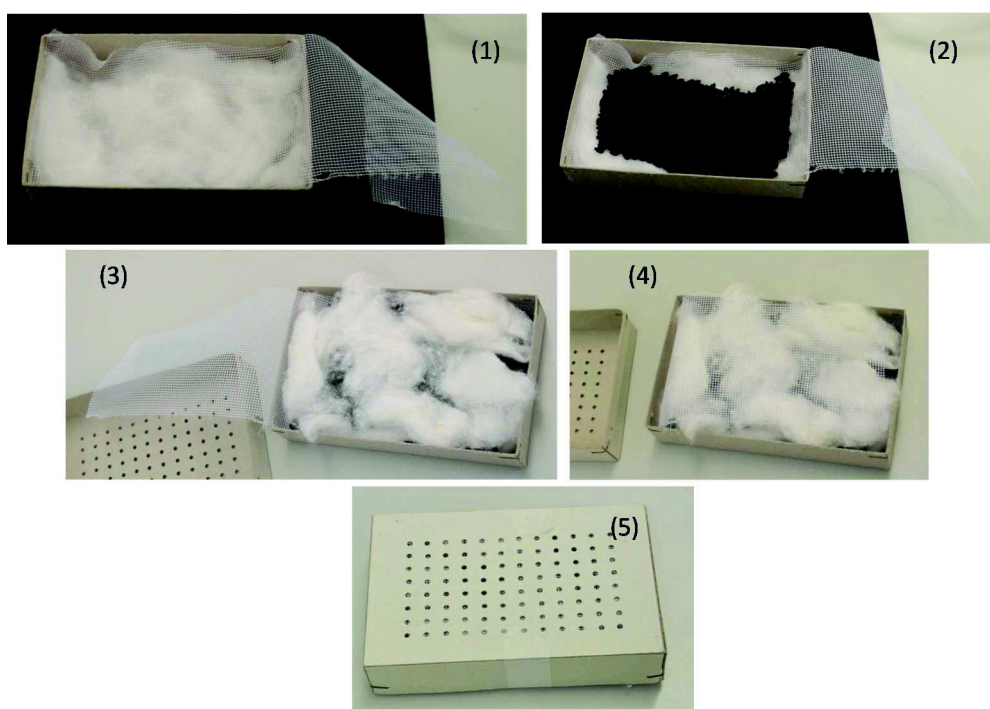


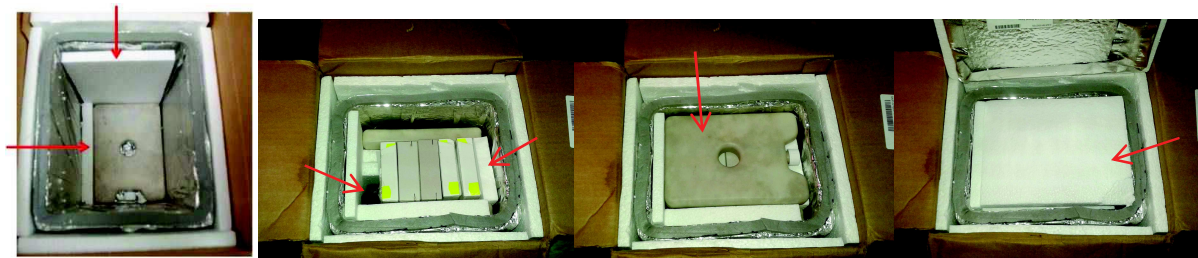
Figure 1. Packing of mature pupae in a carton (photos A. Parker, reproduced with permission).

Once the pupae are placed in these cartons, they are placed in an insulated transport box in the following way and order (Figure 2):

- 1) one S8 pack is placed on the bottom of the insulated box, and two are placed on the sides;
- 2) a bubble wrap or another shock absorber film is placed between the lateral S8 packs and the cartons or petri-dishes with the pupae, to reduce as much as possible vibrations; circular pieces of sponge could be also used but these must be glued to the cartons at least 48h before transport (to avoid potential solvent residues) or alternatively, using double sided adhesive tape (not shown on the figure);
- 3) pieces of polystyrene (or similar) are to be placed between the S8 packs and the walls of the transport container (top, bottom and sides) to fixate the packs so that they cannot vibrate against the cartons or Petri dishes;
- 4) a Hobo[®] data logger is placed inside the insulated transport box to record temperature and relative humidity during transport;
- 5) the top polystyrene piece is placed to cover the content of the container and the transport container is closed.

Four S8 packs can maintain the temperature inside the insulated box at 10 °C for up to 4 days.

Following the above mentioned guidelines, an insulated transport container of 25.5 x 21.5 x 26.5 cm can hold a maximum of 7500 *G. p. gambiensis* pupae. In case the duration of the transport is reduced to 2 days, one S8 pack can be replaced by 2 other pupal cartons, increasing the maximum number of pupae per insulate container to 10,500.



One S8 pack on the bottom of the transport container is fixated by 10 mm of EPS and a piece of 20 x 25 x 160 mm EPS at the side.

Two S8 packs placed on each long side of the transport box and held by 20 mm of EPS at each end of the transport box. Three or four cartons with pupae put inside with air space. A Hobo® data logger place inside the insulated box to record temperature and humidity.

Final S8 pack put on top of 20 mm pieces of EPS and fixated by 20 x 27 x 130 mm piece of EPS at the side.

A polystyrene sheet sits upon final S8 pack. Box lid sits on top.

Figure 2. Packing of the cartons holding the pupae in the transport container (photos G. Gimonneau). Cartons can also be placed horizontally.

Precautions have to be taken that the temperature does not increase during the irradiation of the pupae, as this will cause premature emergence. To maintain the temperature, the cartons containing the pupae can be placed in between two S8 packs during irradiation.

When pupae are irradiated in a facility other than the rearing facility, it is important not to break the cold chain to avoid premature emergence of the pupae. The transport box must be opened in a cold room at 5 °C, where the cylinder used in the irradiator (Figure 3) is stored, together with three S8 packs are placed around two cartons with the pupae.



Figure 3. Irradiation conditions used to maintain the cold chain during irradiation.

Pupae can be transported either by air or by road. Transport by road is only advised if the transport takes less than 24 hours. Transport by air using courier services or air freight is recommended if the production and target areas are remote. Irrespective of the transport method chosen, total pupal transport time should not exceed 4 days.

Each consignment should be accompanied by proper documentation that should be attached to the outside of the transport box. Documents required are export permits, import permits, and certificates that certify that the content of the package does not pose a health hazard and has no commercial value. Other valuable data that should accompany each shipment: the number of pupae in the consignment, larviposition date, start of cooling of the pupae, radiation date and time, radiation dose, the shipping date and miscellaneous comments.

2.2. Conclusion

Notre étude a montré la possibilité de transporter à froid, sur une longue distance pendant plus de deux jours des pupes matures irradiées et d'utiliser les mâles stériles qui en sont issus pour conduire une campagne de lutte avec une composante TIS. Les résultats ont montré que pour maximiser le rendement en mâles stériles disponibles pour les lâchers sur le terrain, les conditions à l'intérieur du colis de transport doivent être contrôlées à $10 \pm 3^\circ\text{C}$ et $> 75\% \text{ HR}$. Ces résultats constituent des données de références pour les futures campagnes PATTEC qui adopteront la même approche.

Chapitre III : Contrôle qualité des mâles stériles de glossines

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Seck et al. 2015). Nous reviendrons brièvement sur le contexte de cette étude, la méthodologie appliquée et les principaux résultats obtenus.

3.1. Etude

L'approche adoptée dans le programme de lutte au Sénégal combine la pose de pièges imprégnés d'insecticides et le lâcher de mâles stériles de *G. p. gambiensis* originaire du Burkina Faso en élevage aux insectariums du CIRDES, Bobo-Dioulasso et du SAS, Bratislava (Bouyer et al. 2010a; Pagabeleguem et al. 2015). La TIS ne peut réussir que lorsque les mâles stériles qui sont destinés aux lâchers ont une bonne capacité d'envol et de survie, et une compétitivité qui soit aussi proche que possible de celle de leurs homologues sauvages mâles (Vreysen 2001; Calkins and Parker 2005; Vreysen 2005). Nous avons vu précédemment que le rendement en mâles stériles disponibles pour le lâcher était de $63,7 \pm 14,1\%$ après le transport. Ces mâles morphologiquement normaux sont-ils tous réellement opérationnels pour la TIS ? La mise en place d'un protocole de contrôle qualité en routine s'est avérée nécessaire afin d'évaluer la qualité des mâles stériles destinés au lâcher et de déceler les faiblesses pouvant conduire à une mauvaise qualité des mâles.

Des pupes mâles irradiées de *G. p. gambiensis* en provenance des insectariums du CIRDES et de Slovak Academy of Sciences (SAS) ont été utilisées pour cette étude. Les pupes reçues une fois par semaine étaient constituées pour chaque origine de 2 lots de 2 500 pupes en moyenne par lot. Un échantillon de 50 pupes était prélevé dans chaque lot pour le test de contrôle qualité (QC) et les pupes restantes ont été émergées pour être lâchées dans le programme d'éradication opérationnelle c.-à-d. les mouches destinées pour le lâcher dans le programme (RF). Les 50 pupes du groupe QC ont été choisies pour évaluer si un petit échantillon de chaque lot de pupes reçues était suffisant pour prédire la qualité des mâles lâchés sur le terrain (RF). Les pupes des groupes QC et RF étaient placées dans les mêmes conditions, à la différence que la boîte contenant les pupes QC a été prolongée d'un cylindre d'envol de 10 cm de haut et 8,4 cm de diamètre. Après émergence, les mouches considérées opérationnelles pour la TIS sont celles qui parviennent à s'échapper du tube en volant et à se retrouver dans la cage d'émergence. Celles-ci étaient ensuite capturées et introduites dans des cages individuelles puis suivies pour évaluer leur durée de vie à partir de leurs réserves de graisse c.-à-d. sans alimentation. Les mouches issues du groupe RF étaient alimentées 2-3 fois avec du sang mélangé de trypanocides

puis lâchées au sol sur le terrain. Les paramètres qualité (émergence, mouches avec des ailes déformées, et habilité d'envol) ont été comparés entre traitements (QC et RF).

Les résultats obtenus en utilisant les données QC nous ont permis de prédire avec une bonne précision les résultats observés dans le groupe RF: sur un jeu de données tests (25%), les pourcentages d'émergence, de mouches avec des ailes déformées et la capacité d'envol ont été fortement corrélés aux prévisions faites sur la base de 75% des données ($P < 10^{-3}$; avec un R^2 de 0,90, 0,94 et 0,95 respectivement). Le modèle a ainsi prédit des pourcentages d'émergence, de mouches avec des ailes déformées et de mouches capables de voler de 72,9%, 10,8% et 34,9%. La médiane de survie des mâles stériles suivis à partir de leurs réserves de graisse était de 6 jours quels que soient l'origine des pupes et le lot.

Les résultats sont détaillés dans l'article :

Seck M.T.[¶], Pagabeleguem S.[¶], Bassene M.D., Fall A.G., Diouf T.A.R., Sall B., Vreysen M.J.B., Rayaissé J.B., Takac P., Sidibé I., Parker P., Mutika G.N., Bouyer J. and Gimonneau G. (2015). Quality of sterile male tsetse after long distance transport as chilled, irradiated pupae. *PLoS Negl Trop Dis* 9(11):e0004229. doi:10.1371/journal.pntd.000422.

RESEARCH ARTICLE

Quality of Sterile Male Tsetse after Long Distance Transport as Chilled, Irradiated Pupae

Momar Talla Seck^{1☯}, Soumaïla Pagabeleguem^{2,3,4☯*}, Mireille D. Bassene¹, Assane Gueye Fall¹, Thérèse A. R. Diouf¹, Baba Sall⁵, Marc J. B. Vreysen⁶, Jean-Baptiste Rayaissé⁷, Peter Takac⁸, Issa Sidibé^{2,7}, Andrew G. Parker⁶, Gratian N. Mutika⁶, Jérémy Bouyer^{1,3,4,9}, Geoffrey Gimonneau^{1,3,4}

1 Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires, Service de Bio-écologie et Pathologies Parasitaires, Hann, Dakar, Sénégal, **2** Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **3** Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France, **4** Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1309 'Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes', Montpellier, France, **5** Direction des Services Vétérinaires, Dakar, Sénégal, **6** Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, **7** Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en Zone Subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **8** Institute of Zoology, Section of Molecular and Applied Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, **9** Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Mixte de Recherche 'Interactions hôtes-vecteurs-parasites-environnement dans les maladies tropicales négligées dues aux trypanosomatides', Montpellier, France

☯ These authors contributed equally to this work.

* pagasoum@yahoo.fr



OPEN ACCESS

Citation: Seck MT, Pagabeleguem S, Bassene MD, Fall AG, Diouf TAR, Sall B, et al. (2015) Quality of Sterile Male Tsetse after Long Distance Transport as Chilled, Irradiated Pupae. PLoS Negl Trop Dis 9(11): e0004229. doi:10.1371/journal.pntd.0004229

Editor: Mark Quentin Benedict, University of Perugia, ITALY

Received: July 1, 2015

Accepted: October 22, 2015

Published: November 12, 2015

Copyright: © 2015 Seck et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The work presented in this article was supported by the Government of Senegal, the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, the Department of Technical Cooperation of the IAEA, the CIRAD (Project "Integrated Vector Management: innovating to improve control and reduce environmental impacts" of Institut Carnot Santé Animale (ICSA) excellence network) and the US State Department. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Background

Tsetse flies transmit trypanosomes that cause human and African animal trypanosomosis, a debilitating disease of humans (sleeping sickness) and livestock (nagana). An area-wide integrated pest management campaign against *Glossina palpalis gambiensis* has been implemented in Senegal since 2010 that includes a sterile insect technique (SIT) component. The SIT can only be successful when the sterile males that are destined for release have a flight ability, survival and competitiveness that are as close as possible to that of their wild male counterparts.

Methodology/Principal Findings

Tests were developed to assess the quality of *G. p. gambiensis* males that emerged from pupae that were produced and irradiated in Burkina Faso and Slovakia (irradiation done in Seibersdorf, Austria) and transported weekly under chilled conditions to Dakar, Senegal. For each consignment a sample of 50 pupae was used for a quality control test (QC group). To assess flight ability, the pupae were put in a cylinder filtering emerged flies that were able to escape the cylinder. The survival of these flyers was thereafter monitored under

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

stress conditions (without feeding). Remaining pupae were emerged and released in the target area of the eradication programme (RF group). The following parameter values were obtained for the QC flies: average emergence rate more than 69%, median survival of 6 days, and average flight ability of more than 35%. The quality protocol was a good proxy of fly quality, explaining a large part of the variances of the examined parameters.

Conclusions/Significance

The quality protocol described here will allow the accurate monitoring of the quality of shipped sterile male tsetse used in operational eradication programmes in the framework of the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign.

Author Summary

An area-wide integrated pest management campaign against *Glossina palpalis gambiensis* has been implemented in Senegal since 2010 that includes a sterile insect technique component. The sterile males used for the releases emerged from pupae that were produced and irradiated in Burkina Faso and Slovakia (irradiation done in Seibersdorf, Austria) and transported weekly under chilled conditions to Dakar, Senegal. Tests were developed to assess the quality (flight ability and survival) of sterile males. To assess flight ability, for each consignment a sample of 50 pupae (QC flies) was put in a cylinder filtering emerged flies that were able to escape the cylinder. The survival of these flyers was monitored under stress conditions. Remaining pupae (RF flies) were emerged and released in the target area of the eradication programme. The quality assessment of the QC flies was a good proxy of the quality of the RF flies. The quality protocol described here will allow the accurate monitoring of the quality of shipped sterile tsetse males used in operational eradication programmes.

Introduction

Tsetse flies are hematophagous insects found in sub-Saharan Africa and are the main vectors of trypanosomes, the causative agents of African Animal Trypanosomosis (AAT) and Human African Trypanosomosis (HAT) [1]. The debilitating disease AAT limits the exploitation of fertile land for agricultural activities in an area of 10 million km² [2] and is considered the main constraint to more productive livestock systems in sub-Saharan Africa [3,4]. The direct annual production losses of cattle in terms of decreased meat and milk production, abortions, etc. are estimated at USD 600–1200 million [5] and the overall annual losses in livestock and crop production have been estimated as high as USD 4750 million [6].

To suppress or eradicate these disease vectors, four methods that are environmentally and economically acceptable can be used in a context of area-wide integrated pest management (AW-IPM) approaches [4,7,8] i.e. the sequential aerosol technique (SAT) [9,10], the deployment of insecticide-impregnated traps/targets [11], the live-bait technology [12] and the sterile insect technique (SIT) [13,14]. The SIT is used throughout the world to suppress, eradicate, contain or prevent the introduction of several insect pests such as fruit flies [15], moths [16], screwworm flies [17–19], mosquitoes [20] and tsetse flies [14]. The effectiveness of the SIT to eradicate tsetse fly populations was demonstrated in Nigeria with *Glossina*

palpalis palpalis [21], in Burkina Faso with *G. palpalis gambiensis*, *G. tachinoides* and *G. morsitans submorsitans* [13,22] and on Unguja Island, Zanzibar with *G. austeni* [14]. In Senegal, a programme is underway to eradicate a *G. p. gambiensis* population from the Niayes area [23–27]. This campaign is part of the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC), an initiative of the African Heads of State and Government to ensure increased food security through better management of the tsetse fly and trypanosomosis problem [28].

The data of the feasibility study (2007–2010) indicated the potential to create a sustainable zone free of *G. p. gambiensis* in the Niayes [24,29], and therefore, the Government of Senegal opted for an AW-IPM approach that included an SIT component. An agreement was made between the Government of Senegal and the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso and the Slovak Academy of Sciences (SAS) in Bratislava, Slovakia to produce the sterile flies for the eradication campaign in Senegal. The male flies were transported as chilled pupae to Dakar where they could emerge under standard conditions [27].

In AW-IPM programmes that have an SIT component, the quality of the released sterile males remains one of the most crucial prerequisites for success, as flies of low quality (i.e. low survival rate and/or deformed wings) can't compete with wild males in the field to mate with females and induce sterility in the native population [8,30,31]. Therefore, routine quality control procedures are crucial for the SIT component to identify weaknesses in production or handling procedures that result in low quality of the sterile males which may lead to potential failure of these programmes [32]. In past tsetse eradication campaigns [13,14,21,22] the rearing facility and target area were not far apart, so there was no need for pupal shipments. As an example, in the eradication programme on Unguja Island, Zanzibar, the sterile male flies were produced in Tanga, mainland Tanzania and the sterile adult flies were collected twice a week with light aircraft and released from the air in biodegradable cartons. A quality control system was implemented that consisted of taking one release carton before loading the aircraft in Tanga and one carton during the release flights. Both in Tanga and Unguja, the flies were released in a specially designed release arena and the following quality parameters assessed: number of flies in the box, mortality, number of non-flyers, sexing error, and feeding status [33].

In this study, we developed and validated a quality control protocol to assess the quality of male *G. p. gambiensis* that were irradiated and shipped as pupae under chilled conditions. Four biological parameters were measured: i) adult emergence, ii) percentage of flies with deformed wings, iii) flight ability of the sterile flies in the insectary and in the field and iv) survival of the flyers (those that were capable of flying out of the cylinder in the insectary) under stress conditions. These parameters were used to assess the reliability of this quality protocol to 1) predict field performance of the flies, 2) monitor and compare the performance of flies from two locations with different treatment protocols, and 3) develop quality criteria for use in feedback mechanisms to improve rearing systems.

Methods

Insectary

The study was carried out at the Institut Sénégalais de Recherches Agricoles / Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service Bio-Écologie et de Pathologies Parasitaires (ISRA/LNERV/BEPP) in Dakar. Insectary conditions were 24–25°C, 75 ± 5% RH and 12:12 light:dark photoperiod for emergence and the monitoring of the flies.

Chilling and irradiation

Male *G. p. gambiensis* pupae from colonies kept at Burkina Faso and Slovakia were irradiated under chilled (4–6°C) conditions to lower their metabolic rate to prevent emergence [27,34]. The SAS pupae were irradiated in a Gammacell 220 (MDS Nordion, Ottawa, Canada) (dose rate of 3.11 Gy.sec⁻¹ on 1 May 2012 and 2.19 Gy.sec⁻¹ on 1 January 2015) or in an X-ray irradiator (Radsourse 2400) (dose rate of 14.30 Gy.min⁻¹) located at the FAO/IAEA Insect Pest Control Laboratory, Seibersdorf, Austria. The CIRDES pupae were irradiated in a ¹³⁷Cs source for 24 minutes 30 seconds to give a dose of 110 Gy. The male pupae were packaged in cartons (for SAS) and in petri dishes (CIRDES) that were placed in insulated transport boxes containing phase change material packs (S8) (PCM Phase Change Material Products Limited, Cambridge-shire, United Kingdom) to maintain the temperature at 8–10°C and shipped to Dakar by commercial aircraft [27].

Quality assessment of sterile males

The study was implemented from May 2012 to January 2015. A shipment of CIRDES and SAS pupae was received every week at the ISRA in Dakar. Each consignment contained two batches (1 and 2) of pupae that had a different larviposition date and consequently had been exposed to a different chilling period before shipping, i.e. batch 1 was chilled at 8°C for one day longer than batch 2 in the source insectary before transport. Each batch contained an average of 2500 pupae. A total of 50 pupae were sampled from each batch for the quality control test (QC) and the remaining pupae were emerged to be released in the operational eradication programme, i.e. the flies destined for release in the programme (RF). The pupae of the QC and RF groups were kept under the same environmental conditions (24–25°C, 75 ± 5% RH and a photoperiod of L:D 12:12 h). The 50 pupae for the QC group were selected to assess whether a small sample of each received pupae consignment was adequate to predict the quality of the shipped and released flies (RF).

Pupae from the RF group

Pupae from the RF group were placed in Petri dishes under ~1cm of sand mixed with a fluorescent dye (DayGlo) (0.5g dye/200g of sand), to mimic the natural emergence conditions in the soil (Fig 1A) and to allow discrimination from wild flies in the monitoring traps as these sterile male flies were released in the operational programme. Emerged flies were sorted and classed as “normal” (flies with no apparent morphological deficiencies) and “abnormal flies” (i.e. with deformed wings). Normal flies were offered at least three bovine blood meals (originating from slaughterhouse of Dakar, with the consent from the slaughterhouse to obtain the blood samples from livestock) containing 10 mg of the trypanocidal drug isometamidium per litre of blood using the *in vitro* silicon membrane feeding system before being transported to the field for release. The trypanocidal drug prevents the cyclical development of trypanosomes in the released sterile males [35–37]. Irradiated and marked males were transported by car to the release sites (~ 1 hour for Diacksao Peulh and Kayar and 10 minutes for the Parc de Hann [24]) in Roubaud-type cages (4.5 x 13 x 8 cm) that were covered with netting with a mesh size of 1 mm x 1 mm, each containing on average 120 sterile males. Cages were kept in climate controlled containers (temperature and humidity of 24–26°C, 75 ± 5% respectively) during the transport and temperature and humidity were recorded every 5 minutes with a Hobo data logger. Flies were released every Friday afternoon between 16:00 and 18:00 h over a white cloth (2 x 1.5 m). Males remaining on the cloth after 5 minutes were counted and considered as non-flyers. Ground releases of these flies took place from May 2012 to March 2013. Thereafter, all sterile male flies were released by air.

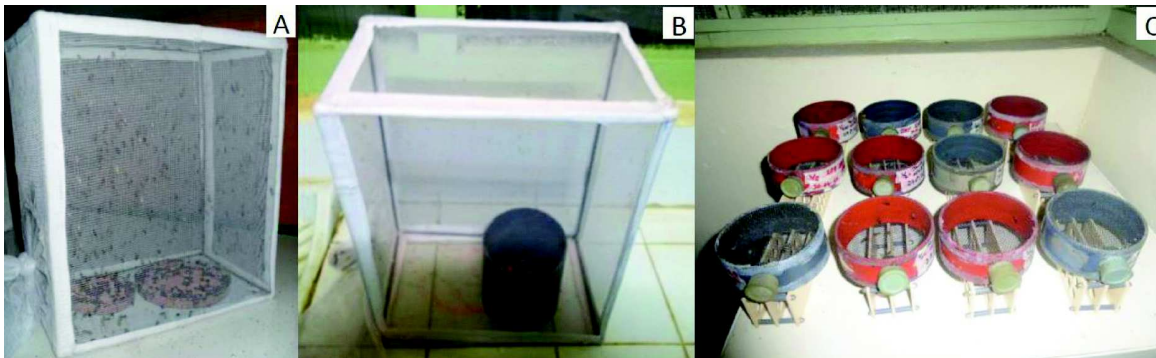


Fig 1. Illustration of the set up of quality assessment of sterile male flies during the tsetse eradication project in Senegal. (A) Emergence of flies destined for release (RF group), (B) emergence of quality control flies (QC group) from pupae placed in a flight cylinder, and (C) monitoring of the survival of QC flies without food. Every morning, flies that had escaped the cylinder were collected from emergence cages (B) and put into circular colony maintenance cages for assessing their survival (1 cage per day).

doi:10.1371/journal.pntd.0004229.g001

Pupae of the QC group

The pupae of the QC group were kept under the same conditions as the RF group but the Petri dishes with the pupae were put in a flight cylinder, i.e. a PVC tube 10 cm high and 8.4 cm in diameter (Fig 1B). The inner wall of the cylinder was coated with unscented talcum powder to prevent the flies from crawling out. This method was initially developed for routine quality assessments of sterile fruit flies [38,39] and moths [40], and adapted here to tsetse flies. This protocol gave an indication of the propensity of the sterile male flies to fly out of the cylinder and only those flies that managed to escape the flight cylinder after emergence were considered as “available for the SIT”. Flies with deformed wings and those with normal wings but unable to escape the flight tube were counted, as well as the number of pupae that did not emerge.

Survival under stress at the insectary

The survival of the sterile males of the QC group that escaped the flight cylinder was assessed under stress conditions (no food). Every morning (except Sundays), the emerged flies were collected and transferred to standard fly holding (10.3 cm diameter and 4.5 cm high) cages (Fig 1C). The flies emerged on a given day were pooled in one cage. Dead flies were counted daily and removed from the cages.

Data analysis

The data sets (both QC and RF groups) on percentage emergence, flies with deformed wings and flight ability were each divided into training and test sets. The training set was used to build the model and the test set to measure its performance [41]. For the data on emergence and percentage of flies with deformed wings, 60% of the entire data set ($n = 364$ rows), selected at random, was used as a training set and the remaining as the test set. For the flight ability, 75% of the entire data set ($n = 80$ rows) was used for the training set and 25% for the test set. The difference in the proportion of data used for the training set in the first and second cases was related to sample size.

A binomial linear mixed effect model was used to analyze emergence rates. The emergence rate measured within the QC group, the origin of the pupae (CIRDES and SAS), the batches (1 and 2) and their second and third order interactions were used as explanatory variables and the emergence rate of the RF group as the response variable. The shipment date was considered as

a random effect. The best model was selected on the basis of the lowest corrected Akaike information criterion (AICc), and the significance of fixed effects was tested using the likelihood ratio test [42,43]. The R^2 (coefficient of determination) was used to describe the proportion of variance explained by the model for the training and test data sets [44,45].

The same analysis was used for the percentage of flies with deformed wings and the percentage of flyers.

Flight ability was analyzed between QC and RF groups using only the CIRDES data sets because field data were not available for the SAS shipments. Flight ability was compared among years (2012, 2013 and 2014) using the same binomial model.

The survival of the sterile males of the QC group that had escaped from the flight cylinder and kept under starvation was analyzed using Kaplan-Meier survival curves. Survival curves were compared between origins (CIRDES and SAS), batches (1 and 2) and years using the coxph model [46]. The median survival was considered to be the average probable survival of the studied flies. The R Software (version 3.1.0) was used for all statistical analyzes [47].

Data accessibility

The complete data sets are available in [S1](#) and [S2](#) and [S3](#) Tables.

Ethical statement

The study was conducted in the framework of the tsetse eradication campaign in Senegal, led by the Directorate of Veterinary Services, Ministry of Livestock and the ISRA/LNERV, Ministry of Agriculture and Rural Equipment. This project received official approval from the Ministry of Environment of Senegal, under the permit N°0874/MEPN/DE/DEIE/mbf.

Results

Validation of the protocol to assess fly quality

A total of 1,581,366 irradiated pupae were used for this study of which 1,271,121 (80.4%) originated from the CIRDES insectary (123 shipments) and 310,245 (19.6%) pupae originated from the SAS insectary (53 shipments).

The emergence rate of pupae of the RF group was significantly greater for shipments originating from CIRDES than those from SAS ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)), as well as for batch 2 pupae than batch 1 pupae regardless of the origin of pupae ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The percentage of flies with deformed wings was significantly lower for the flies that originated from the CIRDES than the SAS flies and for batch 2 pupae than batch 1 pupae regardless of the origin ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The flight ability of the CIRDES flies in the field was significantly better for flies derived from batch 2 pupae than batch 1 pupae ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)).

Adult emergence of pupae of the QC group was similar between origins ($P = 0.8$) but differed between batches regardless of the origin ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The percentage of flies with deformed wings that emerged from the SAS pupae was significantly lower than that for the CIRDES pupae ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). It was similar between batches for CIRDES and different for SAS ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The flight ability was similar between batches ($P > 0.05$; [Table 1](#)).

The comparison of the different parameters between the QC and the RF groups showed that the emergence rates were similar for the CIRDES flies while they were significantly greater in the QC group of the SAS flies ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The percentage of flies with deformed wings was lower in the RF group as compared with the QC group for the CIRDES pupae, whereas it was the opposite for the SAS pupae ($P < 10^{-3}$; [Table 1](#)). The percentage of the CIRDES flies escaping the flight cylinder in the insectary was significantly lower than the percentage of flies

Table 1. Average values \pm sd (%) of different parameters from the QC and RF presented by origin and batch.

| Batch | CIRDES | | SAS | |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Emergence | | | | |
| RF | 72.7 \pm 13.6 ^a | 78.2 \pm 11.5 ^b | 55.9 \pm 18.4 ^c | 66.4 \pm 16.3 ^d |
| QC | 71.1 \pm 15.3 ^a | 76.4 \pm 13.7 ^b | 68.9 \pm 19.0 ^a | 74.5 \pm 16.6 ^b |
| Flies with deformed wings | | | | |
| RF | 8.6 \pm 3.6 ^a | 7.3 \pm 4.5 ^b | 14.2 \pm 8.0 ^c | 12.0 \pm 7.5 ^d |
| QC | 12.4 \pm 7.1 ^d | 11.6 \pm 6.8 ^d | 9.8 \pm 7.5 ^a | 7.8 \pm 6.3 ^b |
| Flight ability | | | | |
| RF | 54.1 \pm 14.6 ^a | 56.0 \pm 12.6 ^b | - | - |
| QC | 34.1 \pm 17.8 ^c | 35.8 \pm 18.0 ^c | - | - |

RF = Pupae destined for release in the operational programme

QC = Pupae of the quality control test

For each parameter (emergence, flies with deformed wing and flight ability) the values with the same letters (amongst columns and rows) are not significantly different ($P > 0.05$).

doi:10.1371/journal.pntd.0004229.t001

taking off in the field after the release ($P < 10^{-3}$) i.e. $34.9 \pm 17.8\%$ and $55.1 \pm 13.5\%$, respectively. The flight ability of batch 2 flies of the RF group was significantly greater than for batch 1 flies ($P < 10^{-3}$) whereas no difference was observed between batches of the QC group ($P = 0.6$; Table 1). The predicted probabilities of occurrence using the QC data allowed us to predict the results observed in the RF group with good accuracy: the emergence rates, percentage of flies with deformed wings and flight ability were strongly correlated to predictions of the training data set ($P < 10^{-3}$; R^2 of 0.90, 0.94 and 0.95 respectively; Fig 2). For the test data set, the model predicted 55%, 53% and 45% of the variances respectively ($P < 10^{-3}$, Fig 2).

Survival under stress

Survival curves of QC flies kept under starvation are presented by batch and origin in Fig 3. Flies from batch 2 pupae survived significantly longer than those from batch 1 pupae for CIRDES ($P = 0.01$) whereas for SAS, batch 2 flies survived marginally longer than from batch 1 ($P = 0.09$) shipments. The CIRDES flies survived marginally longer than the SAS flies ($P = 0.06$). The median survival was 6 days regardless of the batch and origin of pupae (Fig 3). The maximum survival observed was 12 days after emergence for the CIRDES (batch 2) and 10 days for the SAS (batch 2) flies.

Temporal variation of male quality

From 2012 to 2014, the percentage of QC flies escaping the cylinder gradually increased regardless of the origin of pupae ($P < 10^{-3}$; Table 2). Flies lived significantly longer in the survival tests in 2013 and 2014 as compared with 2012 for both CIRDES and SAS flies ($P < 10^{-3}$). Thus, the quality of sterile male flies (flight ability and survival) was significantly improved among years and these improvements were more prominent for flies from SAS (Table 2).

Discussion

The quality protocol implemented in this study was developed for a programme that required long distance transport of chilled male tsetse pupae and was shown to be a good proxy for the

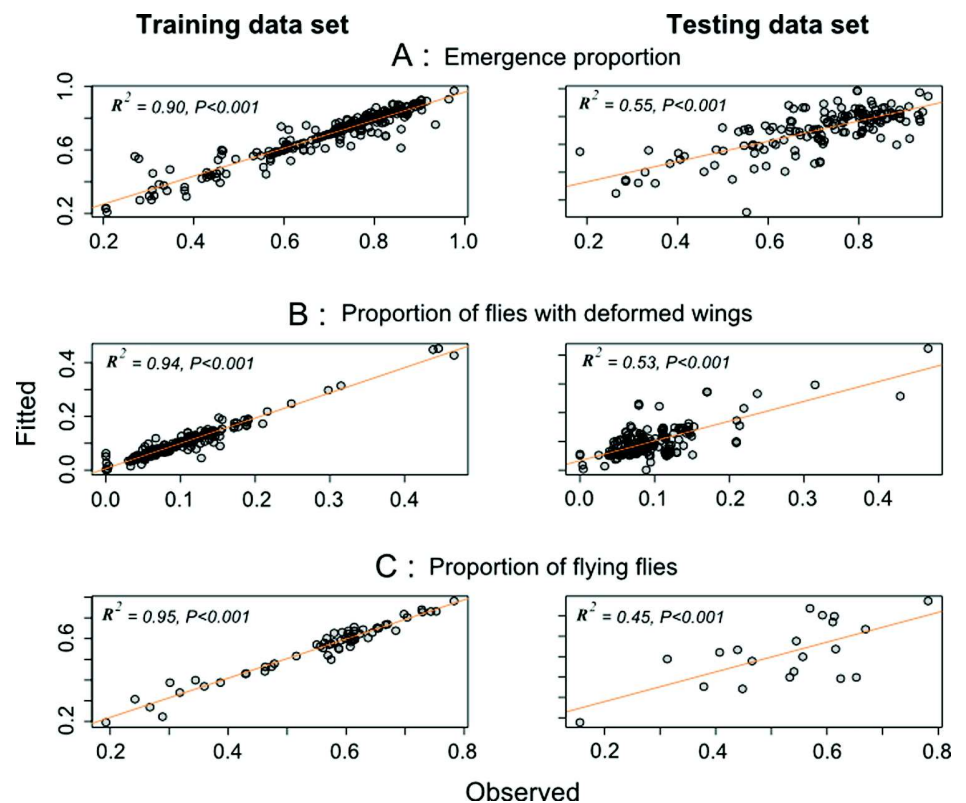


Fig 2. Relationship between the fitted and observed values of the quality assessment parameters. (A) Emergence of pupae, (B) flies with deformed wings, and (C) flying flies from training and test sets of the QC and RF flies. The training set of each parameter (60% of emergence and flies with deformed wings data and 75% of flight ability data) was used to build the model and the test set (the rest of data) to measure the model performance. The fitted values were obtained from the binomial linear mixed model. The emergence rate, percentage of flies with deformed wings, percentage of flying flies within the QC group, their origins and batches were used as explanatory variables and the RF group parameters as explained variables with the shipment date as a random factor. The orange lines give the regressions.

doi:10.1371/journal.pntd.0004229.g002

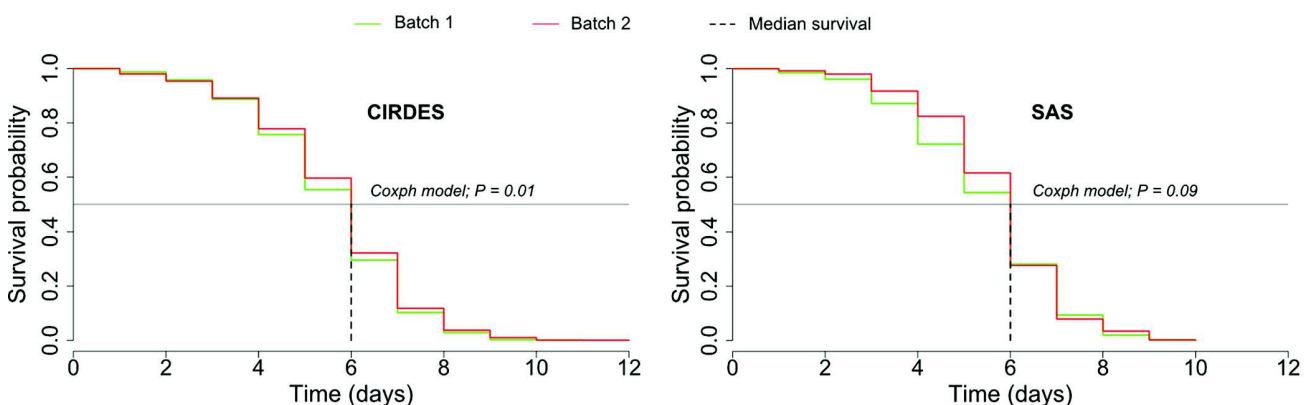


Fig 3. Survival curves of sterile males that were kept without food and had to survive on their fat reserves. Only flies able to escape the flight cylinder were used for this study. The horizontal black line (Y axis = 0.5) was used to determine the median survival (dotted lines).

doi:10.1371/journal.pntd.0004229.g003

Table 2. Percentage (\pm sd) of flies escaping the flight cylinder and their median survival by origin and year.

| Origin of pupae | % flies escaping the tube | | | Median survival (days) | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------|----------------|
| | 2012 | 2013 | 2014 | 2012 | 2013 | 2014 |
| CIRDES | 34.9 \pm 16.9 ^a | 39.7 \pm 19.3 ^a | 48.0 \pm 19.0 ^b | 5 ^a | 6 ^b | 6 ^b |
| SAS | 14.0 \pm 17.0 ^a | 24.2 \pm 10.3 ^a | 54.1 \pm 27.8 ^b | 3 ^a | 6 ^b | 6 ^b |

The data on the same line with a letter in common are not significantly different ($P > 0.05$).

doi:10.1371/journal.pntd.0004229.t002

insectary rearing output. Indeed, the emergence rates, percentage of flies with deformed wings and flyers from the QC and RF groups were highly correlated. Overall, these results highlight that the quality protocol procedures had no negative impact on adult emergence and predicted well the amount of sterile males available for the SIT component. In eradication programmes such as the one implemented in the Niayes of Senegal, thousands of sterile male flies need to be processed weekly for release requiring many preliminary activities in the insectary (to separate and to count normal and abnormal flies after emergence, assess mortality rate and percentage of non-flyers after release in the field). With the results obtained from the QC group, it was shown that all these parameters predicted well the biological quality of the sterile male flies, which will reduce considerably the work load. More importantly, multiple handling of flies (generally at 2–4°C for the sorting) generates stress which reduces their quality which can be avoided using a sample for the quality control test [27].

Quality control protocols for SIT programs were initially developed for fruit flies, especially the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* and has more recently been extended to *Anastrepha* and *Bactrocera* fruit fly species [38,39]. For these insects, the average flight ability after irradiation and transport of pupae was 65% for *C. capitata*, 75% for *Anastrepha suspensa* and 55% for *Bactrocera oleae* [38,39,48]. The flight ability obtained in the present study with *G. p. gambiensis*, BKF strain was on average $35.8 \pm 18.4\%$. Although caution is required when comparing data from different species and when pupae were shipped under different conditions, it provides an indication that our results with *G. p. gambiensis* were rather low. This low propensity to fly could be due to mechanical shocks and vibrations that were absorbed by the pupae during transport or possibly different handling procedures in the different insectaries. In addition, the length of the cooling period of the pupae seems to be an important quality reducing factor, especially in terms of emergence rate. The impact of these different variables on emergence of adults was shown before [27]. Adults emergence may also be affected by excessive temperatures or inappropriate relative humidity during the rearing process [30]. In addition, it is well established that irradiation could potentially lower the quality of the produced flies especially when the irradiation dose that is required to obtain 95–100% sterility is high and therefore results in severe somatic damage [30,49–51].

The released sterile males must be active to find a blood meal, shelter and to compete with wild males for mating with wild females and successfully transfer the sterile sperm, and they must survive long enough to be able to find the virgin females [30]. Data of the QC group indicated that about 20% of the flies that emerged were “normal-looking” flies that had their wings deployed but did not escape the flight cylinder. What is measured here is the propensity of the flies to fly i.e. some of those flies that stayed in the cylinder probably can fly, but for one or the other reason they don’t. This was confirmed by the data from the field in that most of these flies were able to take off from the release cloth; however, they still might be poor flyers (but this was not assessed in this study). Indeed, after the preliminary sorting at the insectary, all

normal-looking flies (i.e. those that were mobile and had deployed wings) were transported to the field and released using the ground release protocol where the flies were released on a cloth (2 x 1.5 m) and checked after 5 minutes.

These observations confirm the necessity to implement a quality control protocol for sterile males to make eradication campaigns more effective. Weekly data on the percentage of released sterile males as compared to the number of shipped pupae allows for crucial feedback information to the rearing facility and to better plan the operational phase of the SIT component of AW-IPM programmes [4]. For example, by improving the packaging and transport protocols (such as the use of cotton for the CIRDES pupae and sawdust/vermiculite for the SAS pupae to cushion the mechanical shocks) flight ability was increased significantly reaching 55% in 2014.

There was no difference between the survival of the sterile males that emerged from the CIRDES and the SAS pupae. This indicates that the quality of the blood diet and the performance of the females in the colonies of the two rearing facilities were equivalent. The sterile males did not receive any blood meals during the survival experiment, and hence, their survival depended only on the fat reserves acquired during larval development. As tsetse reproduce by adenotrophic viviparity [4], these fat reserves are closely linked to the quality of the blood meals that are taken by the female parents. Under these conditions, the median survival of sterile males was 6 days regardless of the origin of the pupae with more than 80% and 10% surviving until 4 and 8 days after emergence, respectively. These results were similar to those observed with *G. pallidipes*, i.e. 90% of *G. pallidipes* males that emerged from pupae that had been exposed to a low temperature of 15°C survived unfed until 4 days but less than 10% survived after 8 days [52]. In order to simulate the proposed use of the chilled adult release system for area-wide tsetse SIT, the teneral male flies of the same tsetse species exposed to a temperature of 7°C for 48 and 72 hours followed by 6 hours at 4°C and monitored without being offered a blood meal showed a median survival of 4 days [52].

The flies that emerged from batch 2 pupae survived on average longer than those emerging from batch 1 pupae indicating that the duration of the chilling at 8°C had a negative impact on fly quality. The median survival of the sterile males of 6 days without food as observed under laboratory conditions is encouraging, as the sterile males that are destined for release are being offered a blood meal at least three times before being released. This will undoubtedly increase their fat reserves thus enhancing their survival until they have found a host and hence, their competitiveness.

In conclusion, although the quality protocol data indicated that the percentage of flyers was less than 40%, the quality of the transported sterile pupae improved with time. More importantly, the data from the field indicate that the competitiveness of those male flies that were released was very good [53] resulting in excellent progress in the eradication campaign [54–56]. Research continues to improve the transport conditions of the pupae to potentially further increase the proportion of flyers.

Supporting Information

S1 Table. Database for the emergence parameters of irradiated pupae after long distance transport as chilled pupae.

(CSV)

S2 Table. Database for the flight ability of the CIRDES flies.

(CSV)

S3 Table. Database for the survival of the sterile males that escaped the flight cylinder.
(CSV)

Acknowledgments

We thank the managers and technicians of CIRDES and SAS insectaries for their technical support, and the technicians of the FAO/IAEA Insect Pest Control Laboratory in Seibersdorf, Austria for the irradiation of the SAS pupae. We thank also Ahmadou Dicko for his help with the data analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MTS JB BS MJBV. Performed the experiments: MTS SP MDB AGF TARD JB. Analyzed the data: SP JB GG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MTS JB BS MJBV SP GG. Wrote the paper: MTS SP MDB AGF TARD BS MJBV JBR PT IS AGP GNM JB GG.

References

1. Buxton PA. The natural history of tsetse flies. An account of the biology of the genus *Glossina* (Diptera). London, UK: London School of Hygiene and Tropical Medicine; 1955.
2. De La Rocque S, Cuisance D. La tsé-tsé : une mouche singulière et dangereuse. *Insecte Numéro*. 2005; 136: 27–31.
3. Itard J. Les trypanosomoses animales africaines. In: Chartier C, Itard J, Morel PC, Troncy PM, editors. *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Editions médicales internationales. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc; 2000. p. 206–450.
4. Vreysen MJB, Seck MT, Sall B, Bouyer J. Tsetse flies: their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *J Invertebr Pathol*. 2013; 112: 15–25.
5. Hursey BS, Slingenbergh J. The tsetse fly and its effects on agriculture in sub-saharan Africa. *World Anim Rev*. 1995; 2: 67–73.
6. Budd LT. DFID-Funded tsetse and trypanosomosis research and development since 1980. United Kingdom: Department of International Development; 1999.
7. Bouyer J, Seck MT, Sall B. Misleading guidance for decision making on tsetse eradication: response to Shaw et al. (2013). *Prev Vet Med*. 2013; 112: 443–446. doi: [10.1016/j.prevetmed.2013.05.017](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.05.017) PMID: [23810624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23810624/)
8. IAEA. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005.
9. Adam Y, Cecchi G, Kgori PM, Marcotty T, Mahama CI, Abavana M, et al. The sequential aerosol technique: A major component in an integrated strategy of intervention against riverine tsetse in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2135. doi: [10.1371/journal.pntd.0002135](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002135) PMID: [23516662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23516662/)
10. Kgori PM, Modo S, Torr SJ. The use of aerial spraying to eliminate tsetse from the Okavango Delta of Botswana. *Acta Trop*. 2006; 99: 184–199. PMID: [16987491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16987491/)
11. Green CH. Bait methods for tsetse fly control. *Adv Parasitol*. 1994; 34: 229–291. PMID: [7976751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7976751/)
12. Thompson JW, Mitchell F a. OM, Rees RB, Shereni W, Schoenfeld AH, Wilson A. Studies on the efficacy of deltamethrin applied to cattle for the control of tsetse flies (*Glossina* spp.) in southern Africa. *Trop Anim Health Prod*. 1991; 23: 221–226. PMID: [1796525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1796525/)
13. Cuisance D, Politzar H, Mérot P, Tamboura I. Les lâchers de mâles irradiés dans la campagne de lutte intégrée contre les glossines dans la zone pastorale de Sédaradougou, Burkina Faso. *Rev Elev Médecine Vét Pays Trop*. 1984; 37: 449–467.
14. Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu Z- R, Juma KG, et al. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *J Econ Entomol*. 2000; 93: 123–135. PMID: [14658522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14658522/)
15. Hendrichs J, Vreysen MJB, Enkerlin WR, Cayol JP. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp. 563–600. http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4051-2_22

16. Bloem S, Carpenter JE, McCluskey A, Fugger R, Arthur S, Wood S. Suppression of the codling moth *Cydia pomonella* in British Columbia, Canada using an area-wide integrated approach with an SIT components. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J, editors. Area-wide control of insect pests. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007. pp. 591–601. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6059-5_55
17. Baumhover AH, Graham AJ, Bitter BA, Hopkins DE, New WD, Dudley FH, et al. Screwworm control through release of sterilized flies. *J Econ Entomol*. 1955; 48: 462–466.
18. Lindquist DA, Abusowa M, Hall MJ. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol*. 1992; 6: 2–8. PMID: [1600222](#)
19. Vargas-Terán M, Hursey BS, Cunningham EP. Eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitol Today*. 1994; 10: 119–122. PMID: [15275496](#)
20. Klassen W, Curtis CF. History of the sterile insect technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp. 3–36. http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4051-2_1
21. Takken V, Oladunmade MA, Dengwat L, Feldmann HU, Onah JA, Tenabe SO, et al. The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bull Entomol Res*. 1986; 76: 275.
22. Politzer H, Cuisance D. An integrated campaign against riverine tsetse flies *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Sci Appl*. 1984; 5: 439–442.
23. Bouyer F, Seck MT, Dicko AH, Sall B, Lo M, Vreysen MJB, et al. Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3112. doi: [10.1371/journal.pntd.0003112](#) PMID: [25144776](#)
24. Bouyer J, Seck MT, Sall B, Ndiaye EY, Guerrini L, Vreysen MJB. Stratified Entomological Sampling in Preparation for an Area-Wide Integrated Pest Management Program: The Example of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the Niayes of Senegal. *J Med Entomol*. 2010; 47: 543–552. PMID: [20695269](#)
25. Dicko AH, Lancelot R, Seck MT, Guerrini L, Sall B, Lo M, et al. Using species distribution models to optimize vector control in the framework of the tsetse eradication campaign in Senegal. *Proc Natl Acad Sci*. 2014; 111: 10149–10154. doi: [10.1073/pnas.1407773111](#) PMID: [24982143](#)
26. Mubarqui RL, Perez RC, Kladt RA, Lopez JLZ, Parker A, Seck MT, et al. The smart aerial release machine, a universal system for applying the sterile insect technique. *PLoS ONE*. 2014; 9: e103077. doi: [10.1371/journal.pone.0103077](#) PMID: [25036274](#)
27. Pagabeleguem S, Seck MT, Sall B, Vreysen MJB, Gimonneau G, Fall AG, et al. Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 259. doi: [10.1186/s13071-015-0869-3](#) PMID: [25927610](#)
28. Kabayo JP. Aiming to eliminate tsetse from Africa. *Trends Parasitol*. 2002; 18: 473–475. PMID: [12473355](#)
29. Solano P, Kaba D, Ravel S, Dyer NA, Sall B, Vreysen MJB, et al. Population Genetics as a Tool to Select Tsetse Control Strategies: Suppression or Eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e692. doi: [10.1371/journal.pntd.000692](#) PMID: [20520795](#)
30. Calkins CO, Parker AG. Sterile insect quality. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp. 269–296. http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4051-2_10
31. Vreysen MJ. Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon*. 2001; 61: 397–411.
32. Vreysen MJB, Gerardo-Abaya J, Cayol JP. Lessons from area-wide integrated pest management (AW-IPM) programmes with an SIT Component: an FAO/IAEA Perspective. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J, editors. Area-wide control of insect pests: From research to field implementation. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007. pp. 723–744. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6059-5_66
33. Vreysen MJB, Zhu ZR, Saleh KM, Ali MY, Shambwana IA. Eradication of *Glossina austeni* Newstead on Unguja Island: 3. Releasing gamma sterilised flies from light aircraft. In: FAO/IAEA, editor. Animal trypanosomosis: vector and disease control using nuclear techniques. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers; 1999. pp. 231–248.
34. Mutika GN, Kabore I, Parker AG, Vreysen MJ. Storage of male *Glossina palpalis gambiensis* pupae at low temperature: effect on emergence, mating and survival. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 465. doi: [10.1186/s13071-014-0465-y](#) PMID: [25287653](#)

35. Bouyer J. Does isometamidium chloride treatment protect tsetse flies from trypanosome infections during SIT campaigns? *Med Vet Entomol*. 2008; 22: 140–143. doi: [10.1111/j.1365-2915.2008.00727.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00727.x) PMID: [18498613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18498613/)
36. Moloo SK, Kamunya GW. Suppressive action of Samorin on the cyclical development of pathogenic trypanosomes in *Glossina morsitans centralis*. *Med Vet Entomol*. 1987; 1: 285–287. PMID: [2979543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2979543/)
37. Van Den Bossche P, Akoda K, Djagmah B, Marcotty T, De Deken R, Kubi C, et al. Effect of isometamidium chloride treatment on susceptibility of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to trypanosome infections. *J Med Entomol*. 2006; 43: 564–567. PMID: [16739416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16739416/)
38. Barry JD, McInnis DO, Gates D, Morse JG. Effects of irradiation on mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae): Emergence, survivorship, lure attraction, and mating competition. *J Econ Entomol*. 2003; 96: 615–622. PMID: [12852596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12852596/)
39. FAO/IAEA/USDA. Product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies, version 6.0 [Internet]. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency; 2014. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/sterile-mass-reared-v6.pdf>
40. Carpenter JE, Blomefield T, Vreysen MJB. A flight cylinder bioassay as a simple, effective quality control test for *Cydia pomonella*. *J Appl Entomol*. 2012; 136: 711–720.
41. James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. An introduction to statistical learning [Internet]. New York, USA: Springer; 2013. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-7138-7>
42. Burnham KP, Anderson DR, editors. Model Selection and Multimodel Inference [Internet]. New York, USA: Springer; 2004. <http://www.springer.com/us/book/9780387953649>
43. Hurvich CM, Tsai CL. Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*. 1995; 51: 1077–1084. PMID: [7548692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7548692/)
44. Johnson PCD. Extension of Nakagawa & Schielzeth's R^2_{GLMM} to random slopes models. *Methods Ecol Evol*. 2014; 5: 944–946. PMID: [25810896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25810896/)
45. Nakagawa S, Schielzeth H. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol*. 2013; 4: 133–142.
46. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling survival data: Extending the Cox Model [Internet]. New York, USA: Springer; 2000. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-3294-8>
47. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.1 [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. <http://www.R-project.org/>
48. Shelly TE, Edu J, Nishimoto J. Chilling and flight ability and mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly. *J Appl Entomol*. 2013; 137: 11–18.
49. Guerfali MM, Parker A, Fadhl S, Hemdane H, Raies A, Chevrier C. Fitness and reproductive potential of irradiated mass-reared mediterranean fruit fly males *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Lowering radiation doses. *Fla Entomol*. 2011; 94: 1042–1050.
50. Parker A, Mehta K. Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Fla Entomol*. 2007; 90: 88–95.
51. Toledo J, Rull J, Oropeza A, Hernández E, Liedo P. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: Optimizing sterility induction. *J Econ Entomol*. 2004; 97: 383–389. PMID: [15154459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15154459/)
52. Mutika GN, Opiyo E, Robinson AS. Effect of low temperature treatment on the quality of male adult *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae) in relation to the sterile insect technique (General Entomology). *Entomol Sci*. 2002; 5: 209–214.
53. Pagabeleguem S. Etude de compétitivité des mâles stériles dans le cadre de l'utilisation de la technique de l'insecte stérile pour l'éradication des glossines dans la zone des Niayes au Sénégal. France—Bénin: Université de Montpellier II—Université d'Abomey Calavi; 2012 p. 31.
54. FAO. Senegal nears first victory in war on tsetse fly [Internet]. 2014 [cited 2 Sep 2015]. <http://www.fao.org/news/story/en/item/211898/icode/>
55. Feeding Knowledge. Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiense* from the Niayes in Senegal—Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiense* from the Niayes in Senegal [Internet]. 2015 [cited 2 Sep 2015]. https://www.feedingknowledge.net/02-search/-/bsdp/6402/en_GB
56. FAO/IAEA. How the FAO and IAEA are assisting the Government of Senegal in its efforts to eradicate tsetse from the Niayes area—Stories, NAFA [Internet]. 2014 [cited 2 Sep 2015]. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/news/2014-tsetse-senegal.html>

3.2. Conclusion

L'étude a permis de mettre au point un protocole de contrôle qualité qui prédit avec précision la qualité des mâles stériles lâchés sur le terrain dans le cadre de la campagne d'éradication en cours dans la zone des Niayes au Sénégal. Il est facilement applicable et permettra un suivi précis de la qualité des mâles stériles utilisés dans les futurs programmes opérationnels d'éradication dans le cadre de la PATTEC.

Chapitre IV : Discrimination entre mâles stériles et sauvages par des outils moléculaires

Ce chapitre fait l'objet d'un article en révision mineure à *PLOS Neglected Tropical Diseases* (Pagabeleguem et al. 2015). Nous reviendrons brièvement sur le contexte de cette étude, la méthodologie appliquée et les principaux résultats obtenus.

4.1. Etude

Pendant la phase d'éradication des glossines, les mâles stériles sont en général marqués avec de la poudre fluorescente avant d'être lâchés (Pagabeleguem 2012a; Seck et al. 2015). Le but étant de pouvoir différencier les mâles stériles des mâles sauvages dans les pièges de suivi de l'impact des opérations de lutte (système sentinelle). Cependant, il arrive que la couleur disparaisse de la mouche à un moment de leur vie sur le terrain et il devient difficile de pouvoir différencier les mâles sauvages des mâles stériles. Dans un contexte d'éradication, comme c'est le cas dans la zone des Niayes au Sénégal, tout doute doit être levé quant à la nature de la mouche qui est capturée sur le terrain (stérile ou sauvage), surtout en phase finale. En effet, les lâchers doivent être poursuivis pendant 6 à 12 mois après la capture de la dernière mouche sauvage. Pour cela, l'objectif de ce travail était de mettre au point une technique de discrimination des mâles stériles/sauvages à partir d'outils moléculaires.

L'hypothèse sur laquelle se base l'outil est que les séquences du cytochrome oxydase I (COI) des mâles stériles lâchés (*G. p. gambiensis* du CIRDES) sont différentes de celles des mâles sauvages.

Au total, 78 mouches ont été utilisées pour l'étude. Pour vérifier l'hypothèse de base, 48 mouches dont 31 mâles stériles reçus de la colonie du CIRDES, 7 mouches capturées à Pout, Sénégal avant les opérations de lâchers et 10 mâles capturés au Burkina Faso (8 à Bama et 2 à la Guinguette) ont été utilisées. Au Burkina Faso, aucune opération de contrôle de glossines n'était en cours dans les sites où les mouches ont été collectées, mais le but était de tester la possibilité d'utiliser cet outil moléculaire sur le terrain d'où est originaire la souche *G. p. gambiensis* de la colonie du CIRDES. En effet, une intervention utilisant des mâles stériles est prévue dans le cadre de la PATTEC dans ce pays. La validation a été réalisée avec 20 mouches capturées pendant les opérations de lâchers dont 17 à Pout et 3 à Kayar dont une partie (10

mouches de Pout) a été analysée en aveugle au niveau moléculaire alors que leur statut était connu (lecture de fluorescence ultra violet non douteuse).

L'ADN de la tête de chaque mouche a été extrait au CTAB (Cethyl trimethyl ammonium bromide) puis une portion (côté 5') du gène mitochondrial COI a été amplifiée à l'aide d'amorces spécifiques CI-J-2195/CULR (Dyer et al. 2008). La purification des produits PCR (Polymerase chain reaction) a été réalisée à l'aide du QIAquick PCR purification kit (Qiagen, ref 28104 et 28106) puis ces derniers ont été séquencés en sous-traitance. Les séquences ont été alignées et comparées en utilisant "Blast" dans GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Les données des séquences pour le gène du COI (888 nucléotides) ont montré que sur les 31 mâles de la colonie du CIRDES, 29 individus ont affiché 100% d'identité, une substitution (nucléotide T au lieu de C) a été trouvée à la position 790 pour un mâle et un individu a montré une séquence de 889 nucléotides incluant un T supplémentaire après la position 822 (insertion). Six des sept mouches capturées à Pout avant les opérations de lâcher étaient 100% identiques entre elles et une mouche a montré une substitution à la position 247 (G au lieu de A). La comparaison entre les mouches sauvages de Pout et les stériles de la colonie CIRDES a permis d'identifier au moins sept substitutions sur les 888 nucléotides séquencés. Les séquences des 10 mâles capturés sur le terrain au Burkina Faso ont montré d'une à cinq substitutions comparées à celles de leurs homologues en colonisation au CIRDES.

L'application de la technique à des mâles capturés sur le terrain pendant les opérations de lâchers a montré que quatre des 17 mouches de Pout et deux des trois de Kayar étaient des mâles stériles (séquences 100% identiques à celles des mâles stériles du CIRDES), et les autres (13 de Pout et une de Kayar) étaient des mâles sauvages (7-8 substitutions le long de la séquence de 888 nucléotides par rapport à l'haplotype de ceux du CIRDES). Les résultats montrent que 100% des 10 mouches de Pout dont leur statut était connu à la caméra UV mais ont été analysées à l'aveugle avec l'outil ont été identifiés correctement.

Les résultats sont détaillés et discutés dans l'article :

Soumaïla Pagabeleguem, Geoffrey Gimonneau, Momar Talla Seck, Marc JB Vreysen, Baba Sall, Issa Sidibé, Jean-Baptiste Rayaissé, Jérémy Bouyer, Sophie Ravel (2015). Molecular tool to discriminate between sterile and wild tsetse flies during eradication programmes. *En révision mineure à PLOS Neglected Tropical Diseases*.

PLOS Neglected Tropical Diseases

A molecular method to discriminate between sterile and wild tsetse flies during eradication programmes that have a sterile insect technique component

--Manuscript Draft--

| | |
|---|---|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | A molecular method to discriminate between sterile and wild tsetse flies during eradication programmes that have a sterile insect technique component |
| Short Title: | A molecular method to discriminate between sterile and wild males during eradication programmes |
| Article Type: | Research Article |
| Keywords: | Area-wide integrated pest management; sterile insect technique; molecular tool; <i>Glossina palpalis gambiensis</i> ; Diptera; Glossinidae |
| Corresponding Author: | Soumaïla Pagabeleguem PATTEC Burkina Faso Bobo-Dioulasso, BURKINA FASO |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | PATTEC Burkina Faso |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Soumaïla Pagabeleguem |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Soumaïla Pagabeleguem |
| | Geoffrey Gimonneau |
| | Momar Talla Seck |
| | Marc JB Vreysen |
| | Baba Sall |
| | Jean-Baptiste Rayaissé |
| | Issa Sidibé |
| | Jérémy Bouyer |
| | Sophie Ravel |

A molecular method to discriminate between sterile and wild tsetse flies during eradication programmes that have a sterile insect technique component

Soumaïla Pagabeleguem^{1,2*}, Geoffrey Gimonneau^{3,4}, Momar Talla Seck³, Marc JB Vreysen⁵,
Baba Sall⁶, Jean-Baptiste Rayaissé⁷, Issa Sidibé^{1,7}, Jérémy Bouyer^{2,4,8,9}, Sophie Ravel¹⁰

¹Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign, 01 BP 1087, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

²CIRAD, UMR CMAEE, F-34398, Montpellier, France.

³Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service de Bio-écologie et Pathologies Parasitaires, BP 2057, Dakar - Hann, Sénégal.

⁴CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France.

⁵Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, PO Box 100, Wagramer-strasse 5, A-1400 Vienna, Austria.

⁶Direction des Services Vétérinaires, 37, avenue Pasteur, BP 67 Dakar, Sénégal.

⁷Centre International de Recherche-développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

⁸National Institute for Tsetse and Trypanosomosis Control and Eradication, Livestock Development Sector, Ministry of Agriculture, Addis Ababa, Ethiopia

⁹Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign coordination office, Rural Economy and Agriculture Department, African Union Commission, PO Box 3243, Addis Ababa, Ethiopia.

¹⁰IRD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France.

*Corresponding author: pagasoum@yahoo.fr

Abstract

Background

The Government of Senegal has embarked since several years on a project that aims at eradicating *Glossina palpalis gambiensis* from the Niayes area. The removal of the animal trypanosomosis would allow the development more efficient livestock production systems. The project was implemented using an area-wide integrated pest management strategy including a sterile insect technique (SIT) component. The released sterile male flies originated from a colony from Burkina Faso.

Methodology/Principal Findings

Monitoring the efficacy of the sterile male releases requires the discrimination between wild and sterile male *G. p. gambiensis* that are sampled in monitoring traps. Before being released, sterile male flies were marked with a fluorescent dye powder. The marking was however not infallible with some sterile flies only slightly marked or some wild flies contaminated with a few dye particles in the monitoring traps. Trapped flies can also be damaged due to predation by ants, making it difficult to discriminate between wild and sterile males using a fluorescence camera and / or a fluorescence microscope. We developed a molecular technique based on the determination of cytochrome oxidase haplotypes of *G. p. gambiensis* to discriminate between wild and sterile males. DNA was isolated from the head of flies and a portion of the 5' end of

the mitochondrial gene cytochrome oxidase I was amplified to be finally sequenced. Our results indicated that all the sterile males from the Burkina Faso colony displayed the same haplotype and systematically differed from wild male flies trapped in Senegal and Burkina Faso. This allowed 100% discrimination between sterile and wild male *G. p. gambiensis*.

Conclusions/Significance

This tool might be useful for other tsetse control campaigns with an SIT component in the framework of the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC) and, more generally, for other vector or insect pest control programs.

Keywords: Area-wide integrated pest management, sterile insect technique, molecular tool, *Glossina palpalis gambiensis*, Diptera, Glossinidae

Author summary

The Government of Senegal has embarked since several years on a project that aims to create a tsetse-free area in the Niayes. The project was implemented using an area-wide integrated pest management (AW-IPM) strategy where the sterile flies used for the sterile insect technique (SIT) component were derived from a colony originating from Burkina Faso. Monitoring the efficacy of the sterile male releases requires the discrimination between wild and sterile males that are sampled in monitoring traps. Before being released, sterile males were marked with a fluorescent dye powder. The marking was however not infallible with some sterile flies only slightly marked or some wild flies contaminated with a few dye particles in the monitoring traps, making it difficult to discriminate between wild and sterile males using a UV camera. We developed a molecular technique based on the cytochrome oxidase gene that efficiently to discriminate between wild and sterile males. This tool might be useful for other tsetse control campaigns with an SIT component or for other vector or insect pest control programs.

Introduction

Tsetse flies (Glossinidae) transmit trypanosomes which cause human African trypanosomosis (HAT) and African animal trypanosomosis (AAT), a debilitating disease of humans (sleeping sickness) and livestock (nagana), respectively [1–4]. The economic cost of AAT in Africa has been estimated at USD 4.75 billion per year [5,6]. For decades, several approaches have been used to manage trypanosomosis, either targeting the parasite using chemotherapy and/or targeting the vector through the use of insecticides. However, less than 2% of the infested area (estimated at around 10 million km²) have been freed of tsetse flies [7]. One of the main reasons for these limited successes has been the reliance on a single control tactic, rather than integrating several control tactics in an area-wide approach [7,8]. There are four methods that are environmentally and economically acceptable that are currently used in a context of area-wide integrated pest management (AW-IPM) approaches to manage populations of tsetse flies: artificial baits (insecticide-treated traps/targets or ITT), insecticide-treated cattle (ITC), aerial spraying using the sequential aerosol technique (SAT) and the sterile insect technique (SIT) [7,8].

The African Heads of State and Government decided in 2000 to increase efforts to address the tsetse and trypanosomosis problem on the African continent and created the Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC) [9]. Under this umbrella, the Government of Senegal initiated a tsetse eradication program in the Niayes area that integrated the SIT with other control tactics such as IIT's and ITC [10,11]. For the SIT component the program used a strain of *Glossina palpalis gambiensis* that was originally colonized at the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. The *G. p. gambiensis* pupae were mass-reared at the CIRDES and the Slovak Academy of Sciences (SAS), Bratislava, Slovakia and supplemented with excess material from a colony maintained at the FAO/IAEA Insect Pest

97 Control Laboratory, Seibersdorf, Austria and transported as irradiated male pupae by air to
98 Dakar, Senegal [12–14]. The pupae were transferred to an insectary in Dakar for emergence
99 and further processing. The sterile males were marked with a fluorescent dye powder
100 (DayGlo®) that was mixed with sand that was put on top of the pupae. Emerging male flies
101 would pick up the powder whilst crawling through the sand, especially in the ptilinum that
102 would later be retracted into the head capsule. The marking of the sterile male flies is required
103 to allow discrimination of sterile from wild flies in the monitoring traps [13] to assess program
104 progress [15]. All flies trapped during the monitoring were transferred to the laboratory and the
105 head capsules examined using a fluorescence camera and / or a fluorescence microscope. In
106 this way, released sterile flies could be distinguished from indigenous flies and the ratio of
107 sterile over wild flies calculated, which is an important parameter for monitoring the efficiency
108 of an SIT campaign [15–17].

109 However, marking flies with fluorescent dye powder is not infallible, and in some situations
110 some flies can be poorly marked (i.e. with just a few powder particles) or conversely, wild flies
111 in the monitoring traps might become contaminated with a few grains of powder. In addition,
112 tsetse flies in the monitoring traps might be predated upon by ants and lose their head, which
113 makes it difficult to differentiate released sterile flies from wild flies.

114 Any doubt must be removed on the origin (sterile or wild) of the sampled flies in the field
115 especially in the final eradication phase. A single erroneously classed fly (through poor marking
116 or through contamination) can result in wrong decisions made by the programme managers, i.e.
117 to either continue or stop the eradication process, with potentially large financial losses as a
118 result. Absence of trapped wild flies in continuous monitoring can indeed be considered as an
119 evidence that the population has been eliminated from the target area [18,19].

A more accurate method that removes any doubt on the origin of caught flies would therefore be very useful, and in this paper we present the development of a molecular tool that is based on the mitochondrial gene COI (cytochrome oxidase I) to discriminate sterile from wild males.

Material and methods

Sampling

Forty eight *G. p. gambiensis* flies were used to create the reference database of COI sequences i.e. to test the basic hypothesis that the COI sequences of the released *G. p. gambiensis* flies from the CIRDES colony were different from wild flies in the target areas in Senegal and Burkina Faso. Thirty one of these males originated from the CIRDES colony, seven flies (three males and four females) were collected in Pout (55 km East of Dakar, Senegal) in September 2012 before the release of sterile males had been initiated in this area [12], ten flies were collected in Burkina Faso, of which eight males were from Segueré (50 km North of Bobo-Dioulasso) in December 2013 and two males were from Guinguette (15 km West of Bobo-Dioulasso) in June 2015 (Table 1). The COI sequences of the CIRDES flies were compared between them and then with those from Pout, Segueré and Guinguette.

The validation of the method was done with twenty flies collected in the field during the release operations in Senegal: seventeen flies (eleven males, five females and one unidentified sex) collected in Pout in December 2014 and January 2015, and three males collected in Kayar (85 North-East of Dakar, Senegal) in July 2012 (Table 1). Among the seventeen from Pout, ten were analyzed blindly at the molecular level while their status (wild or sterile) was known (UV fluorescence reading undoubted) (Fig. 1). The remaining seven flies from Pout and the three from Kayar were doubtful using the UV camera (i.e. it was not possible to class them as wild

or sterile). The COI sequences of these flies were compared to the reference data i.e. to the sequences of the CIRDES colony flies. Female flies were added in this comparative study because the method used to separate male and female pupae in the mass-rearing insectary is not completely accurate i.e. about 3% female pupae remain in male batch after sex separation and are therefore released together with the sterile males during the release operations [13,14].

Flies from the CIRDES colony were killed in a freezer and kept in 70% alcohol at room temperature (around 25°C). The head of the flies collected in the field was removed and stuck on paper and kept at room temperature. We used heads for the genetic analysis because the discrimination with the fluorescence camera is done on the heads and we used those flies, which gave an unequivocal result with the camera, for discrimination with molecular tools.

Table 1. Characteristics of analyzed samples of *G. p. gambiensis* from various countries and sites.

| Country | Site | Operation type | Landscape | Date | Lat | Long | N | Sex |
|--------------|------------|----------------|----------------|-------------|-------|-------|----|------------|
| Senegal | Pout | Before release | Niayes | 09/12 | 14°76 | 17°05 | 7 | 3M+4F |
| Senegal | Pout | During release | Niayes | 12/14-01/15 | 14°76 | 17°05 | 17 | 11M+5F+1NI |
| Senegal | Kayar | During release | Niayes | 07/12 | 14°89 | 17°11 | 3 | M |
| Burkina Faso | CIRDES | Colony | Insectary | 09/12-01/14 | 11°9 | 4°17 | 31 | M |
| Burkina Faso | Seguere | No operation | Gallery forest | 12/13 | 11°7 | 4°14 | 8 | M |
| Burkina Faso | Guinguette | No operation | Gallery forest | 06/15 | 11°12 | 4°26 | 2 | M |

Date of sampling (month/year), GPS coordinates (Lat in North and Long in West), N is the subsample sizes, Sex (M for male, F for female, NI for unidentified).

Fig 1: Pictures of (upper left) a UV camera that is used to visualize the fluorescent dye in the head capsules of sterile males, (upper middle and right) red and green fluorescent dye in the head capsule of *Glossina palpalis gambiensis*, (lower left and middle) doubtful marking with only a few powder particles visible, (lower right) head of a wild fly.

Molecular laboratory methods

DNA was extracted from the head of each tsetse fly using cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and chloroforme:isoamyl alcohol 24:1 followed by precipitation with isopropanol. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify partial sequences of cytochrome oxidase (COI), using the primer pair CI-J-2195/CULR [20]. PCR conditions: 34.9 µl of double distilled water containing 5 µl of 10X PCR buffer, 1 µl of 10 mM dNTP (final concentration 0.2 mM), 1 µl of each 10 µM primer, 6 µl of 25 mM MgCl₂ (final concentration 3 mM) were incubated with 0.5U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals) and 1 µl of template DNA. The temperature cycles were: 5 min at 95°C, 40 cycles of 93°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, then 72°C for 7 min. PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) using the manufacturer's instructions, then sent for sequencing to GATC biotech. For each PCR product sequenced, forward and reverse sequences were aligned and traces examined using CodonCode Aligner (CodonCodeCorporation). Sequences were aligned and trimmed using Blast in GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Ethical statement

The study was conducted in the framework of the tsetse control program in Senegal, implemented by the Division of Veterinary Services, Ministry of Livestock. This project received official approval from the Ministry of Environment of Senegal, under the permit N°0874/MEPN/DE/DEIE/mbf.

Results

Molecular reference data

A total of 48 flies were sequenced to set up the molecular reference data. Sequence data for the mitochondrial gene COI (888 nucleotides) were aligned from the 31 individuals of the CIRDES colony. Among these, 29 individuals displayed 100% identity. A substitution (nucleotide T instead of C) was found at position 790 for one individual and one individual showed a sequence of 889 nucleotides including an additional T after position 822 (Table 2). Of the seven wild individuals that were collected in Pout before the sterile male release operations had started, the sequence of six flies were 100% identical, irrespective of the sex, and one fly (a female) was different from the others by one substitution at position 247 (G instead of A).

The comparison between sequences of wild flies from Pout and those of sterile flies from the CIRDES colony resulted in substitutions in seven or eight positions (Table 2). The sequences of the wild male flies collected in Segueré (eight flies) and Guinguette (two flies), Burkina Faso, all displayed at least one and up to five substitutions compared to the sequences of the sterile males from the CIRDES colony (Table 2).

Validation of the molecular method

The efficiency of the molecular method was tested using flies collected in the field during the eradication operations in Senegal. A total of twenty flies were caught in the field of which seventeen flies (eleven males, five females and one unidentified) originated from Pout and three male flies from Kayar. Four male individuals trapped in Pout displayed 100% homology with the haplotype of the individuals from the CIRDES colony while thirteen (seven males, five females and one unidentified sex) showed between seven and eight substitutions (almost always the same) along the 888 nucleotides sequence (Table 2). For the three males from Kayar, two

individuals displayed 100% identity with the haplotype of the individuals from the CIRDES colony and one differed by eleven substitutions. This means that the four and two males from Pout and Kayar, respectively were sterile males i.e. from the CIRDES colony while the other individuals were wild flies (Table 2). The results showed that all the ten flies from Pout, of which the status was determined by the UV camera but which were analyzed blindly with the molecular method, were identified correctly (Table 3).

Table 2. Discrimination between sterile flies from the CIRDES insectary and wild flies from Senegal and Burkina Faso based on a comparison of the COI sequences.

| Country | Site | Operation type | Sample size (sex) | Comparison to CIRDES flies |
|---------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|---|
| <i>Molecular reference data</i> | | | | |
| Burkina Faso | CIRDES | Colony | 31 M | 29 are 100% identical 1 with 1 substitution (T by C at position 790) 1 with 1 addition (1T after 822) |
| | Seguere Guinguette | No operation | 8 M 2 M | 4 with 1, 2 with 2, 3 with 4 and 1 with 5 substitutions |
| Senegal | Pout | Before release | 7 (3M+4F) | 1 with 7 and 6 with 8 substitutions |
| <i>Validation of the tool</i> | | | | |
| Senegal | Pout | During release | 17 (11M+5F+1NI) | 13 with 7 to 8 substitutions 4 are 100% identical |
| | Kayar | During release | 3 M | 2 are 100% identical 1 with 11 substitutions |

Sex (M=male, F=female and NI= unidentified sex)

Table 3. Results from visual identification of sterile and wild flies using a UV camera and the molecular method that is based on the sequence of the COI gene.

| Collection date | Site | sample | Sex | Camera results | Molecular results |
|-----------------|-------|-------------|------------|------------------|-------------------|
| 20/07/2012 | Kayar | doubtful 22 | Male | doubtful | sterile |
| 20/07/2012 | Kayar | doubtful 23 | Male | doubtful | sterile |
| 20/07/2012 | Kayar | doubtful 24 | Male | doubtful | wild |
| 19/12/2014 | Pout | 3 P8-118 | Male | doubtful | wild |
| 19/12/2014 | Pout | 5 P8-118 | Male | doubtful | wild |
| 19/12/2014 | Pout | 7 P8-118 | Female | doubtful | wild |
| 30/12/2014 | Pout | 2 P8-118 | Male | doubtful | wild |
| 31/12/2014 | Pout | 1 P8-118 | Female | doubtful | wild |
| 15/01/2015 | Pout | 3 P8-118 | Male | doubtful | wild |
| 16/01/2015 | Pout | 4 P8-118 | Indefinite | doubtful | wild |
| 01/01/2015 | Pout | 1 O8-105 | Male | sterile (green) | sterile |
| 30/12/2014 | Pout | 1 O9-101 | Male | sterile (orange) | sterile |
| 02/01/2015 | Pout | 1 O7-104 | Male | sterile (orange) | sterile |
| 19/12/2014 | Pout | 2 O8-105 | Male | sterile (red) | sterile |
| 19/12/2014 | Pout | 6 P8-118 | Female | wild | wild |
| 01/01/2015 | Pout | 3 P8-118 | Female | wild | wild |
| 31/12/2014 | Pout | 2 O9-101 | Male | wild | wild |
| 13/01/2015 | Pout | 1 P8-118 | Male | wild | wild |
| 14/01/2015 | Pout | 2 P8-118 | Female | wild | wild |
| 13/02/2015 | Pout | 1 P5-106 | Male | wild | wild |

Discussion

The aim of this study was to develop a molecular tool to enable discrimination of released sterile males from wild males during an area-wide programme that included an SIT component and that attempted to eradicate a population of *G. p. gambiensis* from the Niayes in Senegal [12]. This issue has very important implications because the efficiency of the SIT must be assessed during and after the operational releases. At the end of the control activities, the absence of wild flies in the monitoring traps during a reasonable period of time will indicate that the population has been eliminated from the target area and the release operations can be stopped [18,19]. Absence of wild flies in the monitoring traps does not necessarily imply absence of wild flies

[21,22] since at very low densities, the efficiency of the trapping system to detect flies is reduced [23–25], hence the need to use probability models to confirm eradication [12]. In the eradication programme against *G. austeni* Newstead on the Island of Unguja, Zanzibar, releases of sterile males were thus maintained for six fly generations after trapping the last wild fly before eradication was declared [17]. It is therefore crucial to identify the exact origin (wild or sterile) of trapped flies that are doubtful and difficult to class due to the presence of only a few fluorescent dye powder grains.

Our results showed that the sequence of the mitochondrial gene COI of a series of flies from the CIRDES colony (i.e. used as sterile male flies for release in the Niayes) were mostly identical and differed from the sequence of the COI of wild flies of Pout (in the Niayes). Sequence of the mitochondrial gene COI of wild flies was also mostly identical. These results confirm the basic hypothesis that sterile males that are derived from a cultured colony are almost identical but differed from their counterparts in the wild. The CIRDES colony is native of Burkina Faso and was established in 1972 from flies collected in the gallery forest of the Guinguette in the Volta River Basin [26]. The Pout area of the Niayes is characterized by artificial vegetation dominated by citrus and mango tree plantations and Euphorbia hedges but without natural surface water [10,27]. The native *G. p. gambiensis* populations in Pout and the remainder of the Niayes, were highly adapted to artificial vegetation and to strong anthropic pressure [10], as *G. p. gambiensis* is a fly that normally inhabits Guinean gallery forests [1,28,29]. The ecological differences of the Burkina Faso habitat (origin of the CIRDES flies) and the Pout habitat, and the complete genetic isolation of the Niayes population from the main tsetse belt in West Africa [30,31] may explain the different sequence of the COI gene. Moreover, it has even been demonstrated recently that these populations can be considered as different ecotypes [32].

Differences in sequences of the COI gene between *G. p. gambiensis* flies from the CIRDES colony and their wild counterparts in Burkina Faso were smaller as compared with those between the CIRDES flies and wild flies from the Senegal sites. These reduced differences might be explained by their common genetic background. However, the selection (i.e. genetic drift) pressures to which the CIRDES flies have been subjected for 43 years have resulted in differences that are large enough to discriminate between wild Burkina Faso and CIRDES colony flies. Even when only one substitution is present in wild males, its position is clearly different from the one substitution observed in one male from the CIRDES colony and thus sufficient to differentiate all males of the CIRDES colony from wild males in Burkina Faso. The data is very important for any potential future eradication programme in Burkina Faso that incorporates an SIT component and will allow to discriminate flies when identification with the UV camera is doubtful.

Of the twenty *G. p. gambiensis* flies that were collected in Pout and Kayar during the operational releases of sterile males and that were used for validation of the molecular method, ten were classed as “doubtful” with the UV camera and discrimination between wild or sterile was ambiguous. The molecular method however, could successfully discriminate with 100% accuracy the wild from sterile flies within this group. Indeed, as is shown in figure 1, some flies had only one or two powder particles on the head and the results of COI sequences highlighted that those flies could be wild or sterile. The origin of the other ten flies was known but they were analyzed blindly and the molecular results were identical to those obtained with the UV camera. This confirms that the molecular method is highly efficient and can be successfully used to distinguish wild flies from the Niayes area and released sterile flies from the CIRDES colony in the framework of the tsetse eradication program.

The cost of the method is estimated at 12-15 Euro/fly, which includes DNA extraction, PCR, purification of the PCR product and sequencing (corresponding itself to 70-80% of the cost).

This cost is not negligible but the expense remains justifiable compared with the large financial losses that might result from wrong decisions due to erroneously classed flies at the end of the eradication phase.

Conclusion

The tsetse eradication project in the Niayes of Senegal adopted a rolling carpet approach and the entire target area is scheduled to be cleared from *G. p. gambiensis* by the end of 2017. The preliminary data showed excellent progress in the eradication campaign [33–35]. In this context, the confirmation of the status of “tsetse-free area” in one block before stopping the release operations was very important. The molecular tool developed in this study allowed discrimination with high accuracy between the released sterile males from the CIRDES colony and their wild counterparts. This tool might be useful for other tsetse control campaigns with an SIT component in the framework of the PATTEC. In particular, eight isolated population of *G. p. gambienis* have been identified recently in West Africa and may be targeted soon by new eradication efforts [31]. More generally, the same tool might be developed for other vector or insect pest control programs.

Acknowledgements

We thank the Managers and Technicians of CIRDES, IPCL, and SAS insectaries for their cooperation.

References

1. Buxton PA. The natural history of tsetse flies. An account of the biology of the genus *Glossina* (Diptera). London, UK: London School of Hygiene and Tropical Medicine; 1955.
2. Itard J. Les trypanosomoses animales africaines. In: Chartier C, Itard J, Morel PC, Troncy PM, editors. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Editions médicales internationales. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc; 2000. p. 206- 450.
3. Laveissière C, Grebaut P, Herder S, Penchenier L. Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine [Internet]. Yaoundé, Cameroun: IRD; 2000. Available: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_03_01/010024101.pdf
4. Leak SGA. Tsetse biology and ecology: Their role in the epidemiology and control of trypanosomosis. Nairobi, Kenya: ILRI (aka ILCA and ILRAD); 1999.
5. Budd LT. DFID-Funded tsetse and trypanosomosis research and development since 1980. United Kingdom: Department of International Development; 1999.
6. Swallow BM. Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. Rome FAO. 1999; Available: http://www.fao.org/waicent/FAOINFO/Agricult/AGAIInfo/programmes/en/paat/documents/papers/Paper_1999.pdf

- 320 7. Bouyer J, Seck MT, Sall B. Misleading guidance for decision making on tsetse
321 eradication: response to Shaw et al. (2013). *Prev Vet Med.* 2013;112: 443–446.
322 doi:10.1016/j.prevetmed.2013.05.017
- 323 8. Vreysen MJB, Seck MT, Sall B, Bouyer J. Tsetse flies: their biology and control using
324 area-wide integrated pest management approaches. *J Invertebr Pathol.* 2013;112: 15–
325 25. doi:10.1016/j.jip.2012.07.026
- 326 9. Kabayo JP. Aiming to eliminate tsetse from Africa. *Trends Parasitol.* 2002;18: 473–475.
- 327 10. Bouyer J, Seck MT, Sall B, Ndiaye EY, Guerrini L, Vreysen MJB. Stratified Entomological
328 Sampling in Preparation for an Area-Wide Integrated Pest Management Program: The
329 Example of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the Niayes of Senegal.
330 *J Med Entomol.* 2010;47: 543–552. doi:10.1603/ME09149
- 331 11. Seck MT, Bouyer J, Sall B, Bengaly Z, Vreysen MJB. The prevalence of African animal
332 trypanosomoses and tsetse presence in Western Senegal. *Parasite.* 2010;17: 257–265.
- 333 12. Dicko AH, Lancelot R, Seck MT, Guerrini L, Sall B, Lo M, et al. Using species distribution
334 models to optimize vector control in the framework of the tsetse eradication campaign
335 in Senegal. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111: 10149–10154. doi:10.1073/pnas.1407773111
- 336 13. Pagabeleguem S, Seck MT, Sall B, Vreysen MJB, Gimonneau G, Fall AG, et al. Long
337 distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact
338 on sterile male yield. *Parasit Vectors.* 2015;8: 259. doi:10.1186/s13071-015-0869-3

- 339 14. Seck MT, Pagabeleguem S, Bassene M, Fall AG, Diouf TAR, Sall B, et al. Quality of sterile
340 male *Glossina palpalis gambiensis* tsetse after long distance transport as chilled,
341 irradiated pupae. PLoS Negl Trop Dis. 2015; in press.
- 342 15. Vreysen MJB. Monitoring Sterile and Wild Insects in Area-Wide Integrated Pest
343 Management Programmes. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile Insect
344 Technique. Vienna, Austria: Springer Netherlands; 2005. pp. 325–361. Available:
345 http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4051-2_12
- 346 16. Vreysen MJB, Saleh KM, Mramba F, Parker AG, Feldmann U, Dyck VA, et al. Sterile
347 insects to enhance agricultural development: the case of sustainable tsetse eradication
348 on Unguja Island, Zanzibar, using an area-wide integrated pest management approach.
349 PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e2857.
- 350 17. Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu Z-R, Juma KG, et al. *Glossina austeni*
351 (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile
352 Insect Technique. J Econ Entomol. 2000;93: 123–135. doi:10.1603/0022-0493-93.1.123
- 353 18. Barclay HJ, Hargrove JW, Clift A, Meats A. Procedures for Declaring Pest Free Status. In:
354 Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile Insect Technique. Dordrecht, The
355 Netherlands: Springer; 2005. pp. 363–386. Available:
356 http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4051-2_13
- 357 19. FAO. Requirements for the establishment of pest free areas. International standards for
358 phytosanitary measures, Part 4 – Pest surveillance. Publication Number 4. Secretariat of
359 the International Plant Protection Convention [Internet]. Rome, Italy: FAO; 1996 p. 8.

360 Report No.: 4. Available:
 361 <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/006/un.fao.4.1995.pdf>

362 20. Dyer NA, Lawton SP, Ravel S, Choi KS, Lehane MJ, Robinson AS, et al. Molecular
 363 phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S,
 364 ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the palpalis group.
 365 Mol Phylogenet Evol. 2008;49: 227–239. doi:10.1016/j.ympev.2008.07.011

366 21. Barclay HJ, Hargrove JW. Probability models to facilitate a declaration of pest-free
 367 status, with special reference to tsetse (Diptera: Glossinidae). Bull Entomol Res.
 368 2005;95: 1–11.

369 22. Hargrove JW. Extinction probabilities and times to extinction for populations of tsetse
 370 flies *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae) subjected to various control measures. Bull
 371 Entomol Res. 2005;95: 13–21.

372 23. Amsler S, Filledier J, Millogo R. Efficacité comparée de différents pièges pour la capture
 373 de *Glossina tachinoides* (Diptera : Glossinidae) au Burkina Faso. Rev Elev Med Vet Pays
 374 Trop. 1994;47: 207–2014.

375 24. Gouteux J-P, Artzrouni M, Jarry M. A density-dependent model with reinvasion for
 376 estimating tsetse fly populations (Diptera: Glossinidae) through trapping. Bull Entomol
 377 Res. 2001;91: 177–183. doi:10.1079/BER200185

378 25. Bouyer J, Solano P, Cuisance D, Itard J, Frézil JL, Authié E. Trypanosomosis: Control
 379 methods. In: Lefevre PC, Blancou J, Chermette J, Uilenberg G, editors. infectious and

380 parasitic diseases of livestock. Lavoisier (Tec & Doc). Paris, France; 2010. pp. 1936–
381 1943.

382 26. Mutika GN, Kabore I, Seck MT, Sall B, Bouyer J, Parker AG, et al. Mating performance of
383 *Glossina palpalis gambiensis* strains from Burkina Faso, Mali, and Senegal. *Entomol Exp*
384 *Appl.* 2013;146: 177–185. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01305.x

385 27. Touré SM. Note sur quelques particularités dans l’habitat de *Glossina palpalis*
386 *gambiensis* Vanderplank, 1949 (Diptera, Glossinidae) observées au Sénégal. *Revue*
387 *d’Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux.* *Rev Elev Med Vet Pays Trop.*
388 1974;27: 81–94.

389 28. Bouyer J, Guerrini L, Cesar J, De La Rocque S, Cuisance D. A phyto-sociological analysis
390 of the distribution of riverine tsetse flies in Burkina Faso. *Med Vet Entomol.* 2005;19:
391 372–378. doi:10.1111/j.1365-2915.2005.00584.x

392 29. Pollock JN. Manuel de lutte contre la mouche tsé-tsé: Ecologie et comportement des
393 tsé-tsé. Rome, Italy: FAO; 1982.

394 30. Solano P, Kaba D, Ravel S, Dyer NA, Sall B, Vreysen MJB, et al. Population Genetics as a
395 Tool to Select Tsetse Control Strategies: Suppression or Eradication of *Glossina palpalis*
396 *gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e692.
397 doi:10.1371/journal.pntd.0000692

398 31. Bouyer J, Dicko AH, Cecchi G, Ravel S, Guerrini L, Solano P, et al. Mapping landscape
399 friction to locate isolated tsetse populations candidate for elimination. *Proc Natl Acad*
400 *Sci U S A.* 2015; in press.

- 401 32. De Meeûs T, Bouyer J, Ravel S, Solano P. Ecotype Evolution in *Glossina palpalis*
402 Subspecies, Major Vectors of Sleeping Sickness. Caccone A, editor. PLoS Negl Trop Dis.
403 2015;9: e0003497. doi:10.1371/journal.pntd.0003497
- 404 33. FAO. Senegal nears first victory in war on tsetse fly [Internet]. 2014 [cited 2 Sep 2015].
405 Available: <http://www.fao.org/news/story/en/item/211898/icode/>
- 406 34. FAO/IAEA. How the FAO and IAEA are assisting the Government of Senegal in its efforts
407 to eradicate tsetse from the Niayes area - Stories, NAFA [Internet]. 2014 [cited 2 Sep
408 2015]. Available: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/news/2014-tsetse-senegal.html>
- 409 35. Feeding Knowledge. Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* from the
410 Niayes in Senegal - Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* from the
411 Niayes in Senegal [Internet]. 2015 [cited 2 Sep 2015]. Available:
412 https://www.feedingknowledge.net/02-search/-/bsdp/6402/en_GB

413 **Supporting Information**

414 **S1 Table.** Database for the COI sequences of the CIRDES flies and wild flies from Senegal
415 and Burkina Faso and their status from visual identification using a UV camera
416 (CSV)

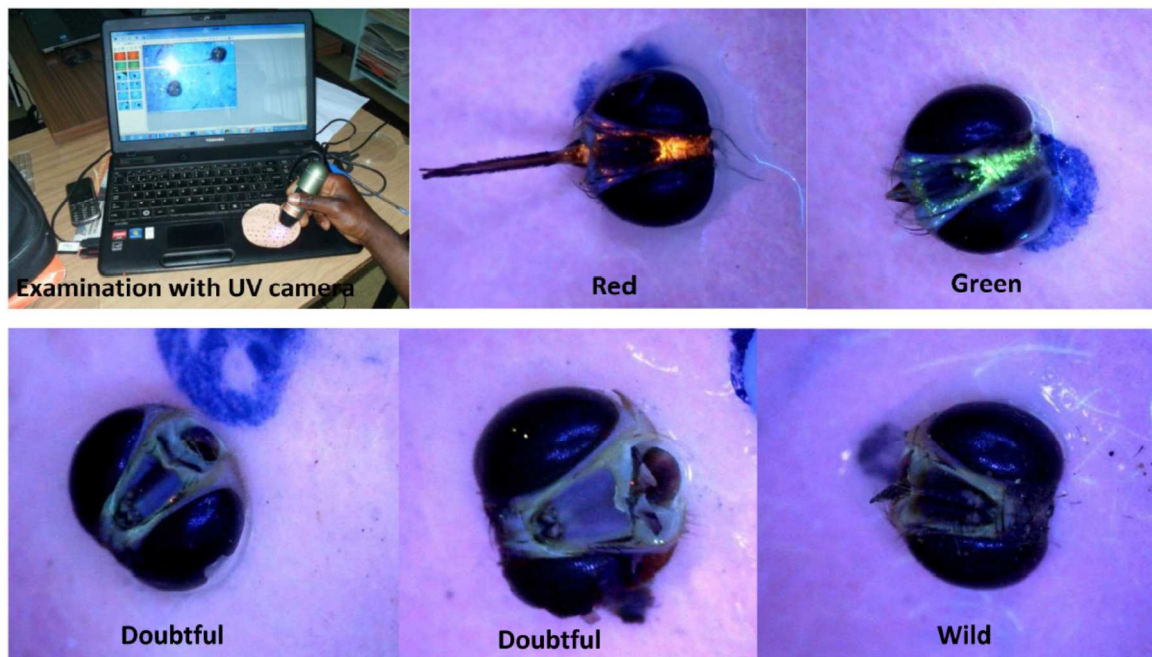


Fig. 1

4.2. Conclusion

L'outil moléculaire développé dans cette étude permet de discriminer avec certitude les mâles stériles issus de la colonie du CIRDES de leurs homologues sauvages. Cette technique peut être utilisée non seulement dans les futures campagnes d'éradication dans le cadre de la PATTEC pour confirmer le statut « zone éradiquée de mouches tsé-tsé » mais pourrait aussi être adaptée dans d'autres programmes contre d'autres insectes ravageurs ou vecteurs.

Chapitre V : Trait de vie de glossines dans différentes conditions climatiques

Ce chapitre a fait l'objet d'un article prêt à être soumis à *Behavioral Ecology*. Nous reviendrons brièvement sur le contexte de cette étude, la méthodologie appliquée et les principaux résultats obtenus.

5.1. Etude

L'application de la TIS nécessite un certain nombre de prérequis parmi lesquels l'élevage en masse de l'espèce de glossine cible (Vreysen 2001). Des travaux récents menés au Mali et au Sénégal avec la souche *G. p. gambiensis* de la colonie du CIRDES (originaire du Burkina Faso, BKF) vieille de plus de 40 ans (Bauer et al. 1984) ont montré qu'elle est compatible et compétitive avec des souches d'autres régions (Pagabeleguem 2012a; Mutika et al. 2013; Vreysen et al. 2013a) d'où la possibilité d'utiliser cette souche BKF pour éradiquer cette espèce dans toute la zone africaine, ce qui est déjà le cas avec le projet d'éradication de cette espèce en cours dans la zone des Niayes (Bouyer et al. 2010a; Pagabeleguem et al. 2015; Seck et al. 2015). Toutefois, la relation entre les mouches tsé-tsé et les éléments du climat c.-à-d. la température et l'humidité relative est très complexe (Buxton 1955). Bien que la souche BKF soit compatible avec des souches d'autres régions, la variabilité climatique d'une saison à une autre ou d'un pays à un autre pourrait compromettre l'expression qualitative de cette dernière (c.-à-d. survie, compétitivité) car des conditions environnementales extrêmes (fortes températures ou de faibles humidités) sont préjudiciables pour les tsé-tsé (Buxton 1955).

Dans le but de sécuriser les opérations de lutte au Sénégal (au cas où BKF n'aurait pas survécu dans les conditions des Niayes), deux nouvelles souches de *G. p. gambiensis* ont été créées. Il s'agit de la souche de *G. p. gambiensis* originaire du Sénégal (SEN) et d'une souche introgressée (SENbkf), issue du croisement entre la souche BKF et la souche SEN. Le terme "introgression" désigne le transfert de gènes d'une espèce vers le pool génétique d'une autre espèce, génétiquement assez proche pour qu'il ait interfécondité, à travers l'hybridation suivie de rétrocroisements successifs avec des représentants de l'espèce hôte (Anderson 1949; Harrison and Larson 2014). La création de la souche SENbkf s'est faite par croisement entre des mâles de la souche SEN et des femelles de BKF, dont on a gardé la fécondité des femelles en backcrossant 4 fois les hybrides avec des mâles de SEN. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un cas entre espèces mais entre souches, la création de SENbkf ayant été faite suivant le principe d'une

introgression, nous la qualifions de souche introgressée. A l'insectarium, la souche BKF produit très bien à 24-25°C, 75±5% (Opiyo et al. 2006).

Il s'agit dans ce chapitre de déterminer d'une part les conditions optimales pour l'élevage en masse des souches SEN et SENbkf, et d'autre part de déterminer la souche qui sera la plus adaptée pour telles ou telles conditions environnementales.

Les souches BKF et SEN sont en élevage à l'insectarium de Insect Pest Control Laboratory (IPCL) Seibersdorf et la souche SENbkf à l'insectarium de Slovak Academy of Sciences (SAS), Bratislava. Les pupes (moins de 3 semaines d'âge) de SENbkf étaient collectées à l'insectarium de SAS puis transportées de Bratislava à l'insectarium de l'IPCL, Seibersdorf. A l'insectarium de l'IPCL, les pupes de BKF et SEN étaient conditionnées avec celles de SENbkf puis transportées à l'insectarium du Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Baillarguet, Montpellier (France) par un service courrier pour les expériences.

Les expériences ont été conduites dans des chambres climatiques à températures et humidités relatives (HR) variables, dans le nouvel insectarium récemment construit au CIRAD de Baillarguet avec un appui financier de la Région Languedoc-Rousillon. La température maximale critique a été évaluée dans des conditions de températures variant de 25°C à 35°C avec un incrément de 5°C et une HR fixée à 60% (c.-à-d. 25°C - 60%, 30°C - 60% et 35°C - 60%). L'humidité relative minimale critique a été évaluée dans des conditions à température constante de 25°C et une HR variant de 40% à 75% (c.-à-d. 25°C - 40%, 25°C - 50%, 25°C - 60% et 25°C - 75%). Dans chaque condition de température et d'humidité relative, les mouches de la même cohorte ont été utilisées pour évaluer la survie et la fécondité (uniquement dans les cas où la longévité des mouches le permettait pour ce paramètre).

Les résultats ont montré que la survie et la fécondité étaient seulement influencées par la variation de la température et non par l'humidité relative (entre 40 et 75%). Quelle que soient les conditions ou la souche de *G. p. gambiensis*, les femelles ont survécu plus longtemps que les mâles ($P < 10^{-3}$). Dans l'ensemble, la survie était meilleure pour BKF que pour SEN et SENbkf, et meilleure pour SEN par rapport à SENbkf. La survie des mouches diminuait avec l'augmentation de la température mais la souche BKF résistait mieux à cette augmentation que les deux autres souches. En plotant les taux de survie des trois souches (mâles et femelles) contre les températures maximales et en considérant une survie moyenne de 50 jours pour les femelles, nous avons obtenu une température optimale d'élevage en masse qui était de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $24,6 \pm 1^\circ\text{C}$ et $23,9 \pm 1^\circ\text{C}$ pour BKF, SENbkf et SEN respectivement.

Ces résultats sont détaillés dans l'article :

Soumaïla Pagabeleguem, Sophie Ravel, Ahmadou H. Dicko, Marc JB Vreysen, Andrew Parker, Peter Taback, Karine Huber, Issa Sidibé, Geoffrey Gimonneau, Jérémy Bouyer (2015). The influence of temperature and relative humidity on survival and fecundity of three *Glossina palpalis gambiensis* strains. *Prêt à être soumis à Behavioral Ecology*.

The influence of temperature and relative humidity on survival and fecundity of three *Glossina palpalis gambiensis* strains

Soumaïla Pagabeleguem^{1,2*}, Sophie Ravel³, Ahmadou H. Dicko⁴, Marc JB Vreysen⁵, Andrew Parker⁵, Peter Takac⁶, Karine Huber^{2,7}, Issa Sidibé^{1,8}, Geoffrey Gimonneau^{9,10}, Jérémy Bouyer^{2,10,11,12}

¹Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign, 01 BP 1087, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

²CIRAD, UMR15 CMAEE, F-34398 Montpellier, France.

³IRD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France.

⁴West African Science Service on Climate Change and Adapted Land Use, Climate Change Economics Research Program, Cheikh Anta Diop University, Dakar-Fann, Sénégal.

⁵Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, PO Box 100, Wagramerstrasse 5, A-1400 Vienna, Austria.

⁶Institute of Zoology, Section of Molecular and Applied Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia.

⁷INRA, UMR1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France.

⁸Centre International de Recherche-développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

⁹Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service de Bio-écologie et Pathologies Parasitaires, BP 2057, Dakar - Hann, Sénégal.

¹⁰CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France

¹¹National Institute for Tsetse and Trypanosomosis Control and Eradication, Livestock Development Sector, Ministry of Agriculture, Addis Ababa, Ethiopia

¹²Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign coordination office, Rural Economy and Agriculture Department, African Union Commission, PO Box 3243, Addis Ababa, Ethiopia.

*Corresponding author: pagasoum@yahoo.fr

Abstract

Tsetse flies occur in much of sub-Saharan Africa where they are the vectors of trypanosomes that cause sleeping sickness or human African trypanosomosis in humans and nagana or African animal trypanosomosis in livestock. The sterile insect technique (SIT) is one of four methods currently used to eliminate tsetse fly populations in an area-wide integrated pest management (AW-IPM) context. Three *Glossina palpalis gambiensis* strains (originating from Burkina Faso (BKF), Senegal (SEN) and a strain produced by introgressive hybridization between the former strains (SENbkf)) were colonized and are now available for use in AW-IPM programmes against this species in West-Africa. A temperature of 24-25 °C and 75 ± 5% RH are the optimal environmental conditions for rearing the BKF strain, but these conditions were unknown for the SEN and SENbkf strains. Moreover, knowledge for each strain on the critical environmental thresholds to survive is essential to determine which strain would be best adapted to a particular environment or ecosystem to use them most effectively in programmes with an SIT component. In this paper, we investigate the survival and fecundity of the three *G. p. gambiensis* strains maintained under various conditions: 25 °C and 40, 50, 60, and 75% RH, 30 °C and 60% RH and 35 °C and 60% RH. The optimal temperature for rearing of the BKF, SENbkf and SEN was 25 ± 1 °C, 24.6 ± 1 °C and 23.9 ± 1 °C, respectively. The survival of this tsetse species was governed by temperature alone, and unaffected by changing humidity within the tested range. The BKF strain better survived temperatures above these optima than the SEN and SENbkf strains but a temperature of about 32 °C was the limit for survival for all strains. The relative humidity ranging from 40 to 76% had no effect on fecundity at 25-26 °C. We discuss the implications of these results regarding tsetse control programmes that incorporate an SIT component.

Keywords: Tsetse flies, area-wide integrated pest management, sterile insect technique, mass-rearing, survival, fecundity, environmental conditions

Introduction

Tsetse flies are the cyclical vectors of human African trypanosomoses (HAT) and African animal trypanosomoses (AAT), which are debilitating diseases for humans (sleeping sickness) and livestock (nagana), respectively (Leak 1999; Itard et al. 2003). The presence of tsetse flies compromise the development of sustainable and productive agricultural systems in over 10 million km² of sub-Saharan Africa (Hursey and Slingenbergh 1995; Feldmann et al. 2005) leading to potential losses in livestock and crop production estimated as high as USD 4,750 million every year (Budd 1999). In this context, vector control is considered as an important component of the integrated management of both HAT (Solano et al. 2013) and AAT (Jordan 1986; Leak 1999; Bouyer et al. 2010; Solano et al. 2010; Bouyer et al. 2013).

Glossina palpalis gambiensis is one of the most important vectors of trypanosomes in West Africa (Cuisance and Politzar 1982; Van den Bossche et al. 2010). In the past decades, managing the disease by targeting the parasite using chemotherapy has shown its limitations due to the development of resistance to the available trypanocidal drugs (Geerts et al. 2001). In addition, vector control programmes that often relied on the use of insecticides and that were not implemented following area-wide principles (Klassen 2005) failed to show sustainable results with re-invasion of the flies from bordering infested areas as a consequence (Warnes et al. 1999). The use of the sterile insect technique (SIT) within an area-wide integrated pests management (AW-IPM) approach appears necessary (at least in West Africa for this riverine species) to mop up the last flies when eradication is the goal (Dicko et al. 2014). Recently, considerable efforts have been directed towards improving the application of the technique against this species in support of eradication efforts in Senegal and other potential countries (Vreysen et al. 2011; Mutika et al. 2013; Vreysen et al. 2013b; Mutika et al. 2014; Pagabeleguem et al. 2015). Indeed, previous work carried out in Mali and Senegal with the Burkina Faso (BKF) strain of *G. p. gambiensis* which has been colonized since more than 40 years, showed its compatibility and competitiveness with *G. p. gambiensis* populations from other countries (Pagabeleguem 2012a; Mutika et al. 2013; Vreysen et al. 2013a). These studies indicated the possibility of using the BKF strain to eradicate isolated populations of this species in selected areas of West Africa such as the Niayes in Senegal (Solano et al. 2010; Bouyer et al. 2015).

Little is however known about the relationship between tsetse flies and environmental factors such as temperature and relative humidity other than it is a very complex issue (Buxton 1955).

In the natural habitat, both climatic parameters determine the spatial and temporal distribution and behavior of the insect (Rogers and Randolph 1986; Pagabeleguem et al. 2012b; Dicko et al. 2014). Although the BKF strain is compatible with strains from other countries, seasonal variations within one country and between countries could compromise important components of the flies' competitiveness i.e. its mating performance and survival. Environmental conditions of high temperature and low humidity are detrimental for the survival of tsetse flies (Buxton 1955) and under such circumstances they will seek resting places with more favourable microclimatic conditions, i.e. greater humidity and lower temperature (Bouyer 2006).

Although it had been decided to use the BKF strain in the Senegal project, and field cage studies had indicated adequate compatibility and competitiveness with the local Senegal population, it was decided to create two new strains that could serve as a back-up in case the BKF strain should fail to perform in certain ecosystems of the Niayes. These were a *G. p. gambiensis* Senegal (SEN) strain that originated from Pout/Sebikotane in the Niayes and an introgressed (SENbkf) strain, obtained from crossing BKF females with SEN males. Whereas the BKF strain had been cultured for more than 4 decades, and was more prolific than the newly created SEN strain (Mutika et al. 2013), it was hypothesized that an introgressed strain that was adapted to an artificial mass-rearing environment (BKF strain) but that had mainly the SEN genetic background would possibly be better adapted to the harsh environment of the Niayes, could potentially perform better than the BKF strain in certain ecosystems. In the Niayes area of Senegal, the ecology of *G. p. gambiensis* populations from which SEN was colonized is quite different from that of other *G. p. gambiensis* populations that thrive in riparian forests. In the Niayes the habitat favoured by *G. p. gambiensis* is constituted by mango and citrus tree plantations, residual riparian thickets, and palm tree plantations, as the flies have adapted to this man-made vegetation and strong anthropic pressures (Touré 1974; Bouyer et al. 2010; Dicko et al. 2014). Moreover, using markers and methods such as microsatellites, mitochondrial DNA, and wing morphometrics, it was shown that the Niayes population was totally isolated from the main tsetse belt in West Africa (Solano et al. 2010; Bouyer et al. 2015) and can be considered as a different ecotype or even sub-species (De Meeûs et al. 2015).

The best environmental conditions for rearing the BKF strain are 24-25 °C, 75 ± 5% RH and 12L:12D light regime (Itard 1976; Sellin et al. 1979; Bauer et al. 1984; Opiyo et al. 2006). But the optimal conditions for rearing the SEN and SENbkf strains remained unknown. In view of the differences in environmental conditions from one region to another, it is crucial to determine which strain would perform best in which particular ecosystem.

Material and methods

Fly strains

Three strains of *G. p. gambiensis* were used in this study: BKF, SEN and SENbkf. The fly material of the BKF and SEN strains was derived from colonies maintained at the Insect Pest Control Laboratory (IPCL) of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Seibersdorf, Austria and the SENbkf flies were derived from a colony maintained at the Slovak Academy of Sciences (SAS), Bratislava, Slovakia.

The BKF strain was established at Maisons-Alfort, France in 1972 using material collected in Guinguette, Burkina Faso. It was thereafter transferred to the Centre de Recherche sur les Trypanosomiasés Animales (CRTA), Burkina Faso, in 1975 (Sellin et al. 1979; Bauer et al. 1984) (CRTA was renamed later into Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES)). In 2009, 8000 pupae of this colony were shipped to the IPCL to establish a colony for research purposes to support the eradication programme in the Niayes (Mutika et al. 2013; Mutika et al. 2014). The colony of the IPCL provided seed material to the SAS where a colony was likewise established to supply additional pupae to the Senegal project should there be a need.

The SEN strain was established at the IPCL from September 2009 to December 2010 from pupae obtained from wild females collected in Pout and Sebikotane and that were shipped weekly to IPCL (Mutika et al. 2013).

The SENbkf strain was developed in 2010 at the IPCL and then transferred to the SAS insectary. Initial crosses were made between SEN males and BKF females, and the hybrid females were backcrossed four times with SEN males. Flies of the fifth generation were then intercrossed for rearing, initially at the IPCL, and later at the SAS. The strain is genetically composed of 97% of the SEN genome and 3% of the BKF genome.

These colonies were maintained in both insectaries at 24-25 °C and 75 ± 5% RH with a 12:12 light/dark cycle. The flies were offered blood meals using an *in vitro* silicon membrane feeding system using bovine blood, frozen at -20 °C and irradiated with 1000 Gy in a commercial irradiator (Feldmann 1994).

Preliminary data from source insectaries

The SENbkf and SEN strains were reared at the SAS and IPCL, respectively, while the BKF strain was reared in both institutes. Production data of the SENbkf and SEN strains were

collected from August 2012 to October 2014 and from January 2010 to September 2014, respectively. Production data of the BKF strain were collected from January 2011 to September 2014 at the IPCL and from April 2010 to September 2014 at the SAS. The weekly datasets of the three colonies were analyzed with colony size, daily mortality and fecundity being the main parameters.

Transport of pupae

Pupae of the SENbkf strain were transported from the SAS, Bratislava to the IPCL in Seibersdorf, where pupae of the BKF and SEN colonies were added and shipped with a courier service to the Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France. Pupae were placed in Petri dishes with the top lid perforated with holes of ~2 mm diameter for aeration. The Petri dishes were placed in a kraft paper air bubble envelope (TAP Comebag® type B (11 x 21.5 cm)) to absorb mechanical shocks during transport. Due to the small size of the SENbkf colony, pupae were collected over one week and pooled to constitute one batch while for BKF and SEN strains, pupae of the same batch had the same age. There were two batches for each shipment and for each strain. On the day of shipment, pupae of the batch 1 were 15 days old for the BKF and SEN strains and 9-15 days old for the SENbkf strain, and those of batch 2 were 8 and 2-8 days old, respectively. Each batch of the BKF/SEN and the SENbkf strains contained on average 200 and 50 pupae, respectively. Pupae were shipped on Tuesdays and were generally received on Fridays.

Experimental conditions

Pupae were divided on receipt into Borel tubes (40 pupae per tube) and kept in an incubation chamber (25 °C, 75 ± 5% RH, 12L:12D) until emergence. Every morning (except Saturday and Sunday), the emerged flies were transferred to Roubaud cages and placed in climatized chambers with adjustable temperature, relative humidity and photoperiod. A constant climate chamber HPP110 (universal Memmert® oven) with an internal size 40 x 25 x 32 cm was also used for the 26 °C - 40% RH treatment. A Kimo® data logger was placed inside each chamber and was programmed to display temperature and relative humidity every minute and to record data every 5 minutes.

The maximum critical temperature was evaluated at temperatures ranging from 25 °C to 35 °C with an increment of 5 °C and a relative humidity fixed at 60%. The minimum critical relative humidity was assessed at a constant temperature of 25 °C and a relative humidity of 40, 50, 60

and 75%. Flies belonging to the same cohorts were used to assess the survival and fecundity. The fecundity was assessed in all treatments where the longevity of flies allowed it. A photoperiod of 12L:12D was maintained for all experimental chambers and light intensity varied from 280 to 500 Lux depending on the position of the cages in the chamber.

Fly survival

Flies newly emerged were separated by sex (the time that the flies become potent for the mating) and put into Roubaud cages (maximum 25 flies per small cage (7.5 x 5 x 4 cm) and 40 flies per large cage (13.5 x 8 x 4.5 cm)) and then placed in the experimental chambers. Due to the low number of flies emerged per strain and sex at some days, flies were often introduced as micro-batches (≤ 40 flies) and each constituted a repetition. Females were put into cages covered with white tulle of large mesh (2.5 mm) and males in smaller mesh cages (1.5 mm). The large mesh allowed larvae (L3) to escape from the cage. Flies were offered a blood meal three times a week (Monday, Wednesday and Friday) on an *in vitro* silicon membrane system using defibrinated sheep blood collected aseptically and previously frozen at -20 °C. The feeding system was installed in a climatic chamber that was maintained at 25 °C and 50% and the system was used for feeding flies from all treatments. The flies remained in the feeding chamber for less than 30 minutes. Mortality was recorded daily (except Saturday and Sunday) for each treatment per strain and per sex until the death of the last individual. The dead flies were sorted into blood-fed and starved fly mortalities.

Strain fecundity

Three to 4 day-old virgin females were mated with 6-8 day-old virgin males (Buxton and Lewis 1934) and put into holding cages at an initial male to female ratio of 1:3. Males and females remained together until all flies had died. Due to the low number of females at some days, the mating was often done in micro-batches and each constituted a repetition. Mating cages were placed in individual laying nest and pupae were collected daily (except Saturday and Sunday) and sorted into normal and aborted third instar larvae. The normal pupae were weighed using an electronic balance Precisa® 410 AM-FR. The production of pupae was recorded daily by treatment and cage. The first larval period (time between female emergence and the production of the first pupae) and the subsequent interlarval period (time between the reproductive cycles) were parameters used to characterize the fecundity of females. Pupae were then kept in an incubated chamber at 25 °C and 75% RH. The number of flies that emerged per treatment was

recorded daily (except Saturday and Sunday) and allowed to calculate the percentage of emerged adults from the total number of pupae for each treatment. Only flies that escaped from the puparial case were considered as emerged.

Data analysis

The survival of flies kept under various experimental conditions was analyzed using Kaplan-Meier survival curves. The median survival was used to determine the survival time for 50% of individuals for each group. Survival curves were compared using the coxph model (Therneau and Grambsch 2000) where the strain, the sex, the temperature, the relative humidity and their second and third order interactions were used as explanatory variables and the survival rate as the response variable. The best model was selected on the basis of the lowest corrected Akaike information criterion (AICc), and the significance of fixed effect was tested using the likelihood ratio test (Hurvich and Tsai 1995; Burnham and Anderson 2004). When analyzing mortality, we considered the average temperatures and humidity to which the flies were subjected the day before their death, to account for a potential variability of the conditions within the climatic chambers. For the fecundity analysis, we considered their average values over ten days before each larviposition. Pairwise comparisons of median survivals between treatments were tested with a Tukey's *Posthoc* test ('glht' function in the 'multcomp' package). The best model was used to plot the survival rate against the maximum temperatures from 20 to 40 °C. From the plot, the mean survival of 50 days for females was used to determine the maximal temperature for the mass-rearing of each strain.

The pupal production was followed by series (cages) and not individually, thus, the first larval period was determined per series. The number of pupae per series was plotted against the age of females and the first highest peak was considered as corresponding to the first larval period. The subsequent interlarval interval was determined by considering the following peak. When there was 2 peaks in an interval less than 7 days, the highest peak was used. The first and subsequent interlarval periods and the pupal weight were analyzed using general linear models (Dobson 2015) where the strain, the treatment and their interactions were considered as fixed variables. For modeling the first and subsequent interlarval periods, the cage number was considered as a random effect while for modeling the pupal weight, the random effect was the emergence date. The smallest AIC of different models was used to choose the best model and the significance of fixed effect was tested using the likelihood ratio test. The R Software (version 3.1.0) was used to perform all statistical analyses (R Development Core Team 2013)

Results

Experimental conditions

The data recorded from Kimo[®] loggers showed that during the experiments, temperature and relative humidity varied around the expected values. Table 1 gives the theoretical values and the real average temperatures and relative humidity experienced by the flies. In the following analyses, we thus used the average recorded conditions instead of theoretical data.

Table 1. Theoretical temperature and relative humidity and average (\pm sd) environmental conditions as experienced by the flies and recorded with the Kimo[®] loggers.

| Theoretical conditions | Recorded conditions | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| | Temperature (°C) | Relative humidity (%) |
| <i>Experimental chambers</i> | | |
| 25°C - 50% | 25.2 \pm 0.5 | 47.7 \pm 8.5 |
| 25°C - 60% | 26.4 \pm 0.2 | 55.2 \pm 1.6 |
| 25°C - 75% | 25.1 \pm 0.4 | 76.1 \pm 8.0 |
| 26°C - 40% | 26.0 \pm 0.0 | 40.3 \pm 0.7 |
| 30°C - 60% | 31.4 \pm 0.8 | 55.1 \pm 2.0 |
| 35°C - 60% | 35.3 \pm 1.3 | 50.2 \pm 2.5 |
| <i>Pupal incubation chamber</i> | | |
| 25°C - 75% | 25.6 \pm 0.3 | 73.4 \pm 3.3 |

A total of 5,984 pupae were received from the ICPL (BKF and SEN) and SAS (SENbkf) insectaries, of which 2,883, 2,245 and 856 were from the BKF (5 shipments), SEN (6 shipments) and SENbkf (7 shipments) strains, respectively. The emergence rates of the adult flies in the pupal incubation chamber (25.6 °C, 73.4%) were 95.1%, 87.3% and 84.4% for the BKF, SEN and SENbkf strains, respectively. Table 2 shows the number of flies by strain, by sex and by treatment used in the experiments. Almost all females that survived until the mating date were used for the fecundity measurements.

Table 2. Distribution of flies used for experiments per strain, sex and treatment

| Treatment (°C - %) | BKF | | SEN | | SENbkf | |
|---------------------------------|------|------|-----|-----|--------|-----|
| | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| 25.2 \pm 0.5 - 47.7 \pm 8.5 | 270 | 465 | 173 | 310 | 40 | 87 |
| 26.4 \pm 0.2 - 55.2 \pm 1.6 | 141 | 219 | 145 | 219 | 82 | 48 |
| 25.1 \pm 0.4 - 76.1 \pm 8.0 | 169 | 150 | 188 | 122 | 90 | 97 |
| 26.0 \pm 0.0 - 40.3 \pm 0.7 | 85 | 172 | 112 | 130 | 51 | 52 |
| 31.4 \pm 0.8 - 55.1 \pm 2.0 | 273 | 179 | 99 | 56 | 16 | 17 |
| 35.3 \pm 1.3 - 50.2 \pm 2.5 | 217 | 134 | 86 | 61 | 12 | 20 |
| Total | 1155 | 1319 | 803 | 898 | 291 | 321 |

Production parameters of the three colonies in the insectaries of origin

Figure 1.A shows the temporal fluctuations in colony size (females) of the three strains in the insectaries of origin. At the IPCL, the daily mortality was significantly higher ($P < 10^{-3}$) for the SEN flies ($1.3 \pm 0.5\%$) than those of the BKF strain ($0.9 \pm 0.6\%$) while in the SAS insectary, the mortality was similar between SENbkf ($1.0 \pm 0.2\%$) and BKF ($1.0 \pm 0.3\%$) flies (Figure 1.B). Considering the insectary as a random variable, the BKF flies had the lowest mortality, followed by the SENbkf, and then the SEN flies ($P < 10^{-3}$). The fecundity was better for the BKF than the SEN and the SENbkf flies, but the SEN colony performed better than the SENbkf colony ($P < 10^{-3}$, Figure 1.C). More importantly, fecundity of the SEN colony increased significantly with time ($P < 10^{-3}$) but not of the SENbkf colony. When restricting the analysis to the BKF colonies reared in both insectaries, a lower mortality and a better fecundity was observed for the colony maintained at the IPCL insectary as compared with the SAS colony ($P < 10^{-3}$).

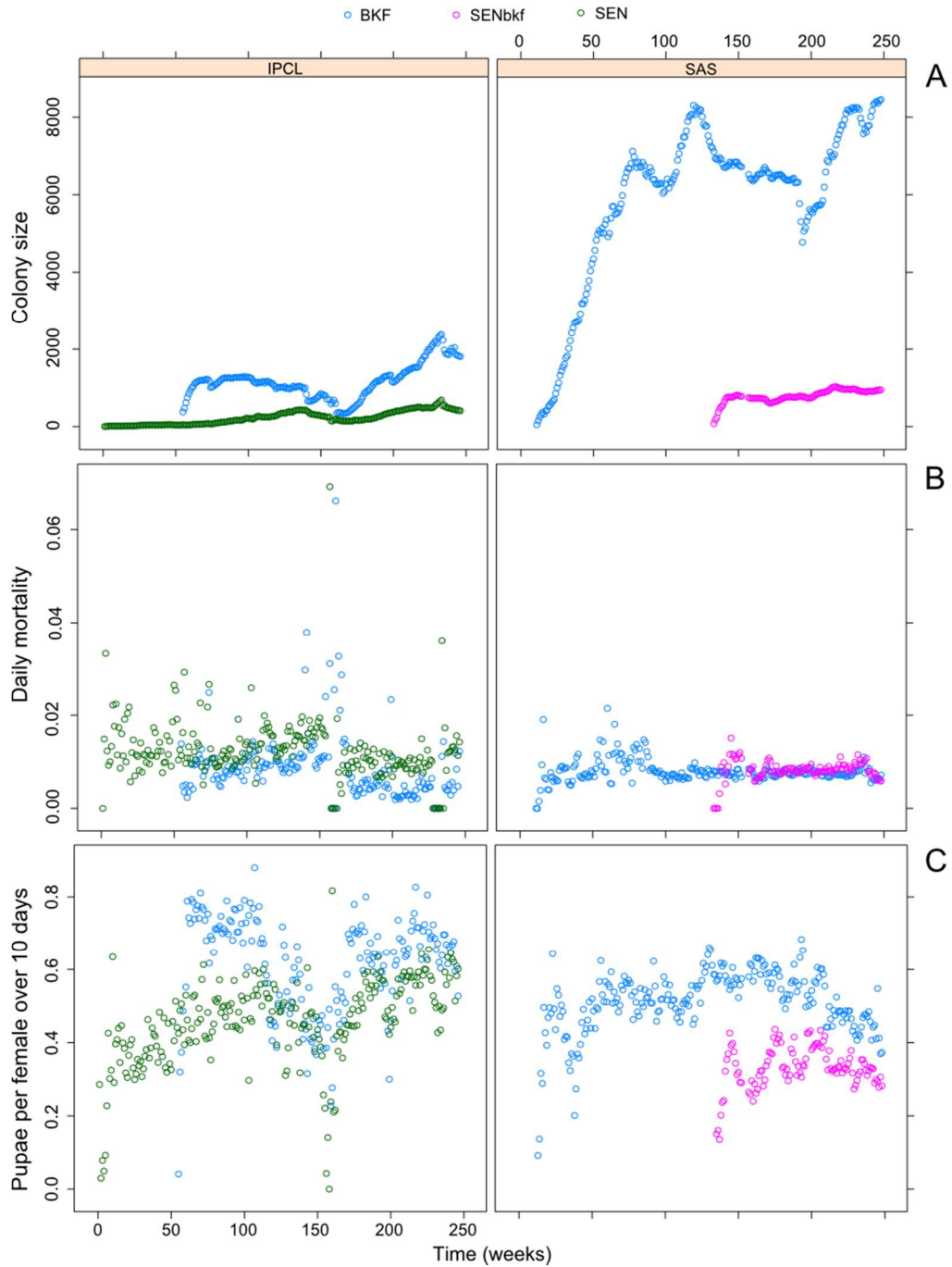


Figure 1. Performance parameters of the various *Glossina palpalis gambiensis* strains (BKF, SEN and SENbkf) in the insectaries of origin. The time was recorded in weeks from 2010. (A) Temporal fluctuations of colony size (females), (B) daily mortality rate, and (C) fecundity.

Relationship between survival and environmental conditions

Survival curves of flies kept in different acclimatized treatments are represented per strain and sex in Figure 2. The median survival obtained from each curves is summarized in table 3. The analyses showed that survival of flies was influenced by strain, sex and temperature ($P < 10^{-3}$).

Females survived significantly longer than males irrespective of the strain and treatment ($P < 10^{-3}$). Survival was very short at high temperatures, i.e. at 31.4 °C, the median survival was 4 days for females and 3 days for males for all strains, while at 35.3 °C, the average survival was 2 days for both sexes (Table 3). Within the same sex, at 25-26 °C there was little difference in survival between 40 and 76% RH (Figure 2, Table 3). Under these environmental conditions, the average median survival for females was 46.7, 42.5 and 37 days for BKF, SENbkf and SEN flies, respectively. For males, it was 27.3, 16.8 and 18.5 days respectively. These results show that the relative humidity (40-76%) has little effect on survival ($P = 0.3$). Overall, BKF flies survived longer than SENbkf and SEN flies and SENbkf flies survived longer than SEN flies ($P < 10^{-3}$). The relationship between daily mortality and average temperature for the three strains is presented per sex in Figure 3.

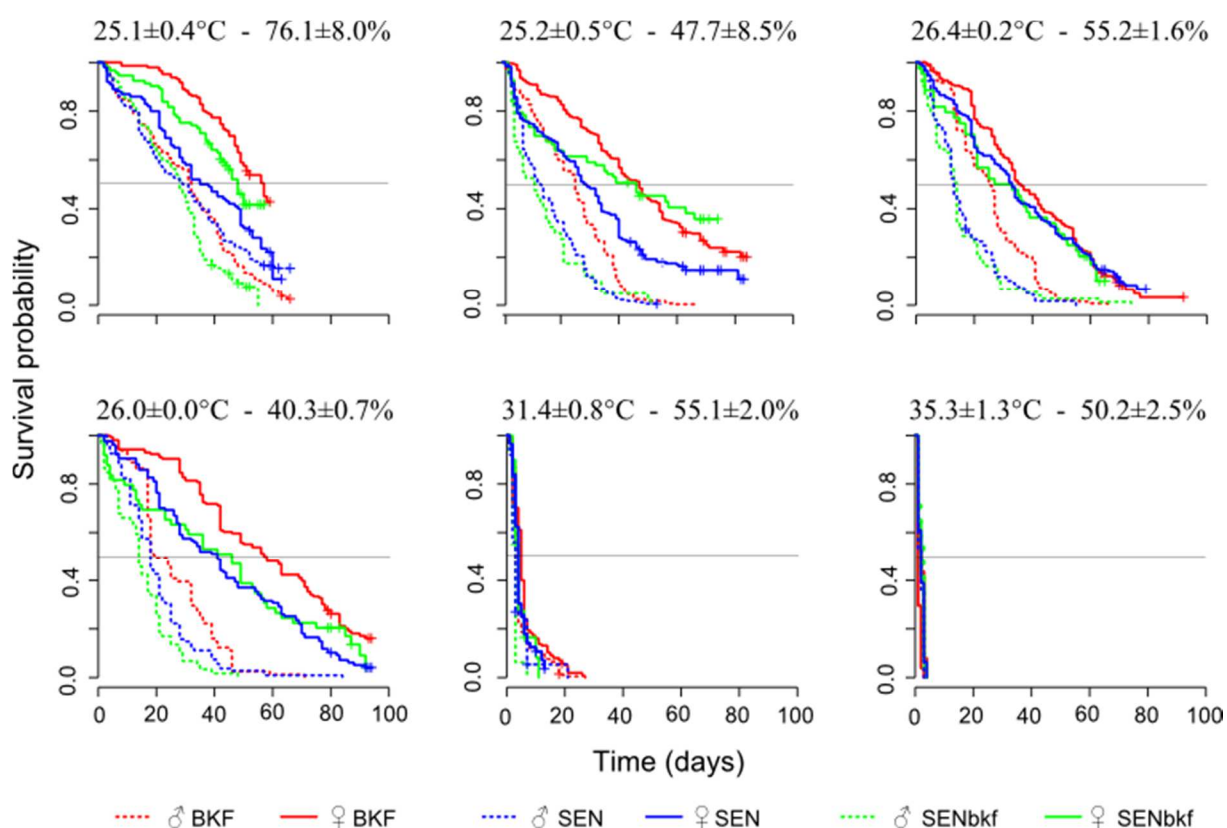


Figure 2. Survival curves of flies by treatment, strain and sex.

Table 3: Median survival (days) per sex, strain and treatment.

| Treatments | Female | | | Male | | |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | BKF | SEN | SENbkf | BKF | SEN | SENbkf |
| 25.1±0.4°C - 76.1±8.0% | 57 ^a | 37 ^{bc} | 48 ^{ab} | 32 ^c | 30 ^c | 28 ^{ce} |
| 25.2±0.5°C - 47.7±8.5% | 47 ^{ab} | 29 ^c | 46 ^{ab} | 25 ^{ce} | 13 ^d | 11 ^d |
| 26.4±0.2°C - 55.2±1.6% | 36 ^{bc} | 33 ^{bc} | 30 ^{bc} | 25 ^{ce} | 13 ^d | 14 ^{df} |
| 26.0±0.0°C - 40.3±0.7% | 58 ^a | 41 ^{bc} | 46 ^{ab} | 20 ^{ef} | 18 ^{def} | 14 ^{df} |
| 31.4±0.8°C - 55.1±2.0% | 5 ^g | 4 ^{gh} | 4 ^{gh} | 3 ^{hi} | 3 ^{hi} | 3 ^{hi} |
| 35.3±1.3°C - 50.2±2.5% | 1 ^j | 2 ^k | 3 ^{ik} | 2 ^k | 2 ^k | 2 ^k |

Median survivals were separated using Tukey's *Posthoc* test and values that have a common letter (amongst columns and rows) are not significantly different ($P > 0.05$).

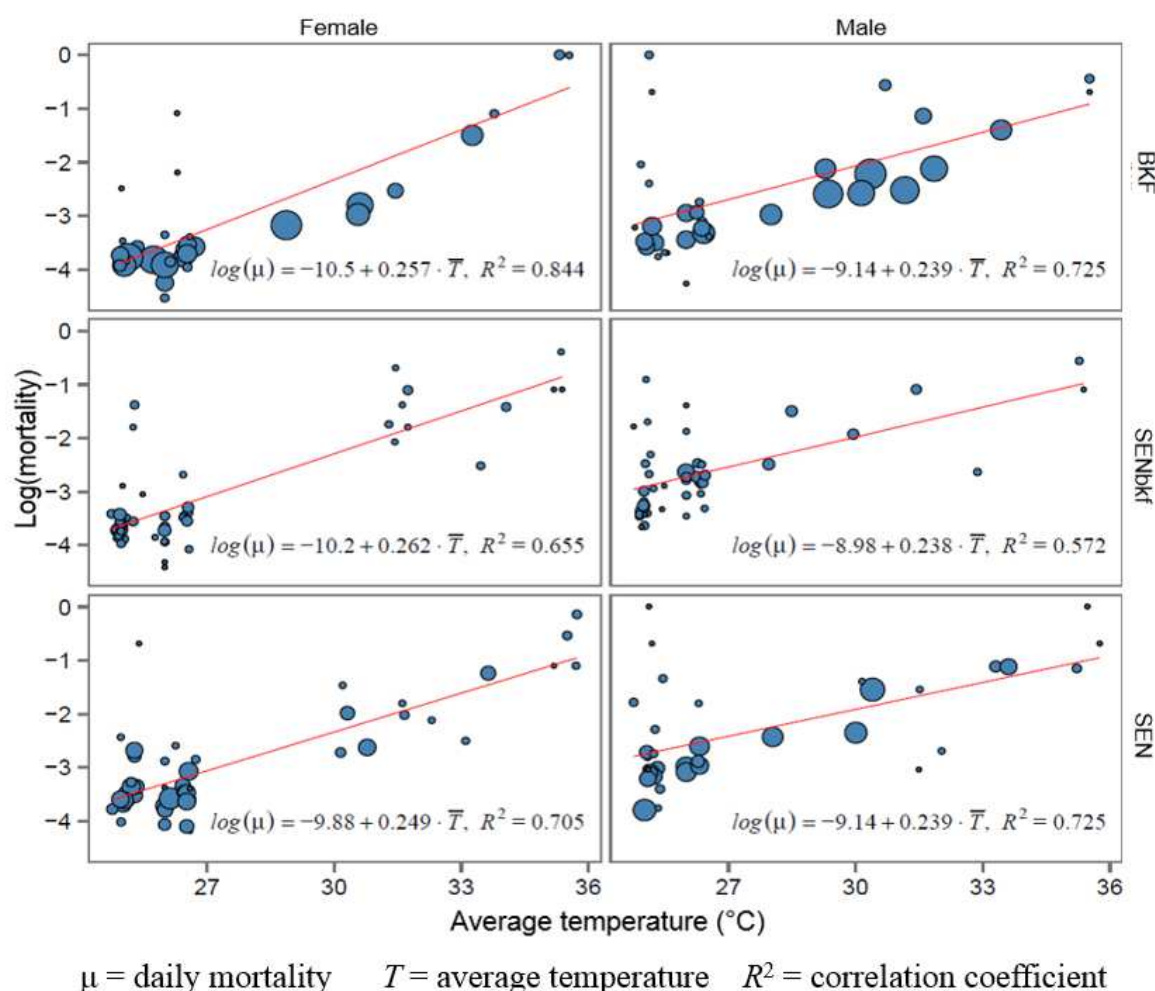


Figure 3. Correlation between daily mortality and average temperature for male and female flies of the BKF, SEN, and SENbkf strains. The size of the data points is proportional to the number of flies at each date of emergence with the equation of the linear model and R^2 also supplied.

The survival rate for the three strains (males and females) plotted against the maximum temperatures i.e. the range of 20-40 °C (at 60% RH) using the binomial mixed model showed a decrease in survival with increasing temperatures (Figure 4). There were negative effects of the interactions between temperature and the SEN and SENbkf strains on survival ($P < 0.05$), showing that BKF flies better resisted to increasing temperatures than SENbkf and SEN flies irrespective of the sex. Females of the SENbkf strain had a similar survival rate as BKF females at moderate temperatures, whereas at increasing temperatures, the resistance of SENbkf females decreased more than that of BKF females until reaching the same level as SEN females (Figure 4). Males of the SENbkf strain had the lowest resistance to increasing temperatures when compared with the BKF and SEN males (Figure 4). The introgression thus showed increased resistance to high temperatures for females but not for males. Above 32 °C, all flies, irrespective of the strain and sex, died rapidly.

From the plots, a maximum temperature of 26, 25.6 and 24.9 °C corresponded to a mean survival of 50 days for the BKF, SENbkf and SEN females, respectively.

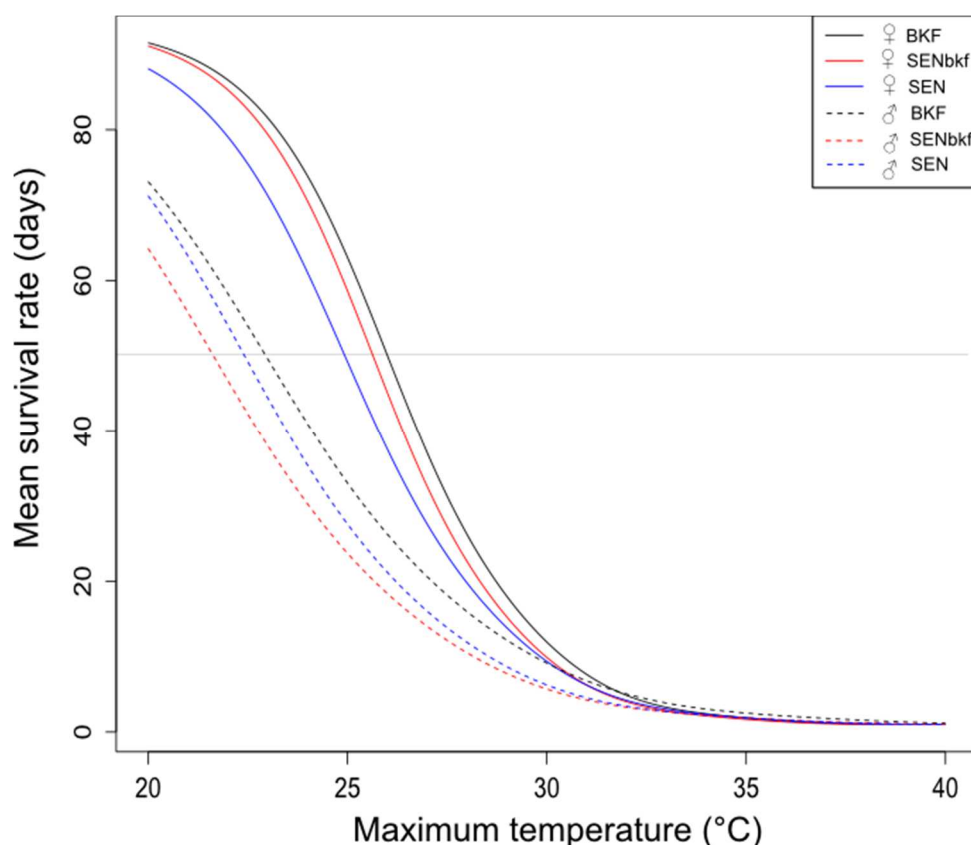


Figure 4. Mean survival rate of the BKF, SEN, and SENbkf strains plotted against the maximum temperature. The relative humidity was maintained constant at 60%.

Fecundity in relation with environmental conditions

Fecundity of the different strains was assessed using a range of relative humidity values (40 - 76%) and a temperature of 25 and 26 °C since above 30 °C, survival was too low to monitoring fecundity.

At 25-26 °C and between 40 and 76% RH, the first larviposition (time between female emergence and the production of the first third instar larva) was fairly similar for the BKF, SEN and SENbkf strains (Table 4). The BKF, SENbkf and SEN females produced their first larva on average on day 19.7, 19.2 and 19.0, respectively. These results indicate that the relative humidity as well as the strain of *G. p. gambiensis* had no influence on the first larviposition day ($P > 0.05$).

For all strains, at 25-26 °C, the relative humidity had no effect on the interlarval period ($P > 0.3$). Overall, the analysis shows a significantly shorter interlarval period for BKF (8.5 days) females as compared with SEN (10.3 days) and SENbkf (10.4 days) females ($P < 0.05$).

At 25-26 °C, the average pupal weight was similar between strains, irrespective of the experimental relative humidity ($P > 0.7$; Table 4); average (\pm sd) values of 20.6 ± 1.4 , 19.8 ± 1.7 and 19.4 ± 1.3 mg were obtained for the BKF, SEN and SENbkf strain, respectively. On the other hand, emergence rate was significantly higher for BKF flies ($93.5 \pm 9.4\%$) as compared with SEN ($87.6 \pm 18.5\%$) and SENbkf ($87.9 \pm 19.0\%$) flies ($P < 10^{-3}$). There was no significant effect of relative humidity on pupal weight and adult emergence ($P > 0.05$).

Table 4: Productivity rate and emergence rate of pupae according to various experimental conditions.

| Treatments (°C - %) | First larviposition day | | | Interlarval period (days) | | | Mean weight of pupae (mg) | | | Emergence (%) | | |
|------------------------|-------------------------|-----|--------|---------------------------|------|--------|---------------------------|-----------------------|------------------------|---------------|------|--------|
| | BKF | SEN | SENbkf | BKF | SEN | SENbkf | BKF | SEN | SENbkf | BKF | SEN | SENbkf |
| 25.1±0.4 - 76.1±8.0 | 21 | 20 | 19 | 9.3 | 8 | 10 | 21.6±1.5 ^a | 21.0±2.3 ^a | 19.4±2.7 ^{ab} | 93.4 | 87.7 | 93.5 |
| 26.4±0.2 - 55.2±1.6 | 19 | 17 | 20 | 9.4 | 10 | 12 | 18.4±2.8 ^b | 17.9±3.2 ^b | 18.6±1.8 ^b | 88.1 | 80.7 | 77.1 |
| 25.2±0.5 - 47.7±8.5 | 19 | 20 | 19 | 7.3 | 9.8 | 11 | 21.3±2.2 ^a | 20.7±2.4 ^a | 18.9±2.7 ^b | 94.9 | 89.5 | 89.0 |
| 26.0±0.0 - 40.3±0.7 | 20 | 19 | 19 | 8 | 11.6 | 9.3 | 20.7±2.5 ^a | 20.4±3.5 ^a | 19.3±2.4 ^{ab} | 95.7 | 91.7 | 92.0 |

For the mean weight of pupae, the values that have a common letter (amongst columns and rows) are not significantly different ($P > 0.05$).

Discussion

The aim of this study was to assess the effect of different temperatures and relative humidity on the productivity and survival of three strains of *G. p. gambiensis* to determine the optimal conditions for mass-production of the new strains (SEN and SENbkf) and to define the critical maximum temperature and critical minimal relative humidity for each strain. This question has very important implications because the African Heads of States and Governments took the decision in 2000 to increase efforts to address the tsetse and trypanosomosis problem on the African continent under the auspices of the African Union (PATTEC) (Kabayo 2002). For West Africa this entails AW-IPM programmes against *G. p. gambiensis* that thrive in riparian and forest environments, and eradication strategies will require the use of the sterile insect technique. The results of this study will allow the optimisation of the mass-rearing of the three strains that are currently colonized and guide programmes that include an SIT component to select the strain best adapted to the local environmental conditions of the target area.

We found that female *G. p. gambiensis* survived significantly longer than male flies irrespective of the strain and environmental conditions except at the sub-lethal temperatures. The difference in lifespan between sexes is common in insects and this seems to be genetically determined. Similar results were found with *Aedes albopictus* at constant temperatures (Calado and Silva 2002; Delatte et al. 2009).

At higher temperatures, survival of the flies was very low i.e. the median survival was 4 days at 31 °C and 2 days at 35 °C for the two sexes (at 60% RH). Similar results were found with *G. fuscipes fuscipes* at 30 °C and 19% RH (Mellanby 1936a). (Mellanby 1936a) found that at a temperature of 30 °C, the flies died quicker at a higher than at a lower humidity. *G. f. fuscipes* (Mellanby 1936a), *G. morsitans* (Jack 1939), *G. tachinoides* and *G. m. submorsitans* (Buxton and Lewis 1934) flies can escape death at sub-lethal temperatures by evaporating water, but they can only do so for a short period (some hours) and when the relative humidity is low.

The BKF strain showed better survival as compared with the SEN and SENbkf strain even at high temperatures irrespective of the sex. Tsetse flies can regulate their water losses (Buxton 1955; Leak 1999; Laveissière et al. 2000), that allows them to survive in hotter environments by lowering their internal temperature (Laveissière et al. 2000). It has been reported that this “cooling effect” varies among species and determines their ability to survive in some environments (Jackson 1945). For example, teneral *G. f. fuscipes* and *G. morsitans* exposed for 24 hours to 25 °C and 50% RH, lost 3.2 and 2.7 mg water, respectively for an average weight of 22 and 19 mg (Jackson 1945). This difference seems related to size but this appeared not to

be the case with these *G. p. gambiensis* strains that had the same pupal size. Our results suggest that this capacity to support higher temperatures might also vary with populations within the same species. This is all the more probable since differences in habitat preferences are observed between these two populations (Touré 1974; Bouyer et al. 2005; Bouyer et al. 2010; Seck et al. 2010) and because BKF and SEN are presently separated by a natural barrier preventing gene flow, thus evolving independently (Touré 1974; Bouyer et al. 2005; Seck et al. 2010; Solano et al. 2010; Bouyer et al. 2015). This can have consequences on behavior (Gimonneau et al. 2010) and physiology between the three strains that could explain the observed differences in their ability to survive at high temperatures.

The difference in colonization time of the three strains suggests an adaptation to breeding conditions for BKF that was colonized more than 4 decades ago (Sellin et al. 1979; Bauer et al. 1984), while SEN and SENbkf are in culture for only 5 years (since 2010) (Mutika et al. 2013). This hypothesis is supported by data from the IPCL insectary where the productivity of SEN flies at 25 ± 1 °C and $75 \pm 5\%$ RH after 4 years of colonization reached the same level than that of BKF for fecundity but not for survival.

Genetically, the SENbkf strain contains 3% of the nuclear genome of BKF and 97% of the genome of SEN, whereas it's mitochondrial DNA is 100% BKF (maternal transmission). The survival ability of SENbkf females at moderate temperatures could be explained by the influence of mitochondrial DNA or epigenetic factors that appeared to be transmitted by the BKF strain and its propensity at high temperatures, by the expression of genetic traits acquired from the SEN strain. The epigenetic characters can be transmitted to offspring without encoding in the DNA sequence (Feng et al. 2010). The culturing of the BKF strain in an environmental controlled insectary at 25 ± 1 °C and $75 \pm 5\%$ RH for more than four decades could have resulted in the development of some epigenetic characters that could have been transmitted to the SENbkf strain. Further research is required to confirm the validity of this hypothesis of epigenetic character expression versus mitochondrial DNA and to better understand epigenetic regulatory mechanisms and how they converge to control the SENbkf survival ability.

In view of the performance of the BKF strain with respect to temperature variation, it's use in the *G. p. gambiensis* eradication campaign in the Niayes area, Senegal seems to be justified as the environmental conditions prevailing in the target area, i.e. 25-30 °C and 60-80% RH (Dicko et al. 2014) correspond to the optimal conditions for this strain in terms of survival and competitiveness. This was confirmed in field pilot trials where BKF sterile males that were released showed good competitiveness in most of the ecosystems of the Niayes (unpublished

data). In addition, only colonies of his strain were large enough to produce the weekly required number of sterile males for release in the Niayes.

At 25-26 °C and with a relative humidity ranging from 40 to 76%, we found no effect of humidity on survival of the flies regardless of the strain, indicating that the different humidity conditions appeared to have no effect on the metabolism of the flies. These results are in agreement with the findings of some other authors who observed that at 24 °C *G. f. fuscipes* lost about 0.47 mg fat in 24 hours at relative humidity levels of 19 to 88% (Mellanby 1936a; Jackson 1949) and (Jackson 1949) found that at 25 °C the fat loss in 24 hours for *G. palpalis*, *G. morsitans* and *G. swynnertoni* teneral males was also the same within a range of 19-88% RH. The same absence of humidity effect was found with other insects. Indeed, fasting bed-bugs, kept for various periods at five different temperatures, ranging from 8 to 37 °C, and at different relative humidity (0, 30, 60 and 90% RH), used the same amounts of food reserves at each humidity level for a given temperature, although more water evaporated from those kept in dry air than in humid air (Mellanby 1932).

Our results indicate that the mean survival (50 days) corresponded to a maximum temperature of 26, 25.6 and 24.9 °C for the BKF, SENbkf and SEN strains, respectively. This confirms earlier data of the BKF strain as the optimal temperature for BKF mass-rearing is 25 ± 1 °C (Itard 1976; Sellin et al. 1979; Bauer et al. 1984; Opiyo et al. 2006). This means that with 25 ± 1 °C as optimal temperature for BKF mass-rearing, those of SENbkf and SEN must be slightly lower i.e. decreased of -0.4 °C for SENbkf (24.6 ± 1 °C) and -1.1 °C for SEN (23.9 ± 1 °C). Our results are supported by preliminary data (from the insectaries of origin) indicating that the mortality of SEN and SENbkf flies at 25 ± 1 °C and $75 \pm 5\%$ was greater than that of BKF. Regarding the optimal relative humidity, that for BKF ($75 \pm 5\%$) can be considered for the two other strains since a range from 40 to 76% RH did not affect the survival of the three strains. Above 30 °C, the survival of flies was so low that fecundity could not be assessed. Previous laboratory studies on *G. f. fuscipes* showed that a constant temperature of 30 °C caused sterility in females, with abnormal development of the ovaries and embryos failing to hatch from the eggs (Mellanby 1937). In the same way, *G. pallidipes* pupae kept at 31 °C as well, non-viable flies emerged (Potts 1940). Below 30 °C, the only temperature where the fecundity was assessed was 25-26 °C and thus the effect of temperatures between 26 and 30 °C could not be evaluated and other experiments would be needed.

The relative humidity (40-76% at 25-26 °C) had no effect on the reproduction of the three *G. p. gambiensis* strains. The same result was observed with *G. morsitans* (Jack 1939) and *G. f.*

fuscipes (Mellanby 1936b) where insemination rates and pupae production were not affected by humidity but by temperature.

Our data indicate that at 25-26 °C and 40-76% RH the female *G. p. gambiensis* produces its first larva when about 19 days old. These results do not differ significantly from those obtained in previous studies. (Pollock 1982) found that the tsetse female (irrespective of the species) at 25 °C produces her first larval on day 18 to 20 post emergence. According to Mellanby (1937), the development of the *G. f. fuscipes* first larva takes a minimum of 18 or 19 days at 24 °C, made up of a minimum of 8 days for ovarian development, 3 to 4 days for embryonic development and 7 days for larval growth in the uterus. In *G. morsitans* and *G. swynnertoni*, the ovulation is delayed by about 2 to 3 days (Jack 1939; Vanderplank 1947).

A mean interlarval period of 8.5 days was observed for the BKF strain and 10 days for the SEN and SENbkf strains at 25-26 °C and 40-76% RH. These results show that the interlarval period of BKF was shorter than what was obtained for other species, but the data for the SEN and SENbkf strains were in line with previous data obtained under stable insectary conditions, i.e. an interlarval period of 10 days at 26 °C was obtained for *G. palpalis palpalis* (Geigy 1948), a mean of 9.9 days (range of 9 to 11 days) at 24 °C for *G. f. fuscipes* (Mellanby 1937), an interlarval period of 11 days at 24 °C for *G. morsitans* (Jack 1939) and 13-14 days at 24-26 °C for *G. tachinoides*, (Buxton and Lewis 1934). In view of the long period that the BKF strain is already under cultivation, it is likely that selection mechanism favored increased fecundity, as the BKF strain performed better than the two other strains.

Models developed using field data to predict the first larval and interlarval periods of *G. pallidipes* and *G. morsitans* (Hargrove 1994; Hargrove 1995) indicated that the first larval period was slightly shorter for flies under field conditions as compared with laboratory flies, but there was no difference for the subsequent interval periods (Hargrove 2004). The estimated time to produce the first larva was between 14-17 days post emergence depending on the temperature, i.e. at 25 °C the predicted time was 15.9 days (Hargrove 2004; Childs 2011). The difference between the first larval period under laboratory conditions and that under field conditions could be due to the specific behavior of tsetse flies in the field, where they minimize the effects of extreme temperatures by using microenvironments, i.e. refuges when the temperatures are high, and resting in direct sunshine at low temperatures (Hargrove 1995). Previous findings have shown that in the field, tsetse appear to live at temperatures 2 to 6 °C lower than the ambient temperature (corresponding to the constant temperature of the

laboratory) (Hargrove and Coates 1990). For this reason, caution must be taken in the interpretation of results predicted from field experiments.

In conclusion, the survival of *G. p. gambiensis* flies appeared to be governed mainly by temperature, and was unaffected by changing humidity within the explored range. The BKF strain resisted better to higher temperatures than the SEN and SENbkf strains but the temperature limit of survival remained at about 32 °C for all of them.

Acknowledgements

We thank the technicians of the FAO/IAEA IPCL in Seibersdorf and the SAS in Bratislava insectaries for their technical support and their cooperation. We also thank Bernadette Tchicaya and Christophe Estienne for their technical support in CIRAD insectary. This work was supported by SCAC of the Embassy of France in Burkina Faso, IFS - Syngenta foundation, Languedoc Roussillon (insectary), IAEA and CIRAD (project 'Integrated Vector Management: innovating to improve control and reduce environmental impacts' of Institut Carnot Santé Animale (ICSA) excellence network).

References

- Bauer B, Filledier J, Kabore I. 1984. Large scale rearing of tsetse flies (Diptera, Glossinidae) in the C.R.T.A. Bobo-Dioulasso, Burkina based on in vitro feeding techniques. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 37:9–17.
- Bouyer J, Dicko AH, Cecchi G, Ravel S, Guerrini L, Solano P, Vreysen MJB, De Meeus T, Lancelot R. 2015. Mapping landscape friction to locate isolated tsetse populations that are candidates for elimination. Proc. Natl. Acad. Sci. [accessed 2015 Nov 11]. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1516778112>
- Bouyer J, Bouyer F, Donadeu M, Rowan T, Napier G. 2013. Community- and farmer-based management of animal African trypanosomosis in cattle. Trends Parasitol. 29:519–522.
- Bouyer J, Seck MT, Sall B, Ndiaye EY, Guerrini L, Vreysen MJB. 2010. Stratified Entomological Sampling in Preparation for an Area-Wide Integrated Pest Management Program: The Example of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the Niayes of Senegal. J. Med. Entomol. 47:543–552.
- Bouyer J. 2006. Ecologie des glossines du Mouhoun au Burkina Faso: intérêt pour l'épidémiologie et le contrôle des trypanosomoses africaines [PhD]. [Montpellier, France]: Université de Montpellier II.
- Bouyer J, Guerrini L, Cesar J, De La Rocque S, Cuisance D. 2005. A phyto-sociological analysis of the distribution of riverine tsetse flies in Burkina Faso. Med. Vet. Entomol. 19:372–378.

- Budd LT. 1999. DFID-Funded Tsetse and Trypanosomosis Research and Development Since 1980. United Kingdom: Department of International Development.
- Burnham KP, Anderson DR. 2004. Model Selection and Multimodel Inference. New York, USA: Springer. [accessed 2015 Jun 27]. <http://www.springer.com/us/book/9780387953649>
- Buxton PA. 1955. The natural history of tsetse flies. An account of the biology of the genus *Glossina* (Diptera). London, UK: London School of Hygiene and Tropical Medicine.
- Buxton PA, Lewis DJ. 1934. Climate and tsetse flies: laboratory studies upon *Glossina submorsitans* and *tachinoides*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B:175–242.
- Calado DC, Silva MAN da. 2002. [Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*]. Rev. Saúde Pública 36:173–179.
- Childs SJ. 2011. Theoretical levels of control as a function of mean temperature and spray efficacy in the aerial spraying of tsetse fly. Acta Trop. 117:171–182.
- Cuisance D, Politzar H. 1982. Elevage de *Glossina palpalis gambiensis* en Afrique: Bilan de six années d'élevage sur animaux nourriciers. In: Sterile Insect Technique and Radiation in Insect Control. Vienna, Austria: IAEA. p. 137–146.
- Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. 2009. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. J. Med. Entomol. 46:33–41.
- De Meeûs T, Bouyer J, Ravel S, Solano P. 2015. Ecotype Evolution in *Glossina palpalis* Subspecies, Major Vectors of Sleeping Sickness. Caccone A, editor. PLoS Negl. Trop. Dis. 9:e0003497.
- Dicko AH, Lancelot R, Seck MT, Guerrini L, Sall B, Lo M, Vreysen MJB, Lefrancois T, Fonta WM, Peck SL, et al. 2014. Using species distribution models to optimize vector control in the framework of the tsetse eradication campaign in Senegal. Proc. Natl. Acad. Sci. 111:10149–10154.
- Dobson AJ. 2015. An introduction to statistical modelling. Cambridge: P.M.E. Altham, University of Cambridge.
- Feldmann U, Dyck VA, Mattioli RC, Jannin J. 2005. Potential impact of tsetse fly control involving the sterile insect technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 701–723.
- Feldmann U. 1994. Guidelines for the rearing of tsetse flies using the membrane feeding technique. In: Ochieng'-Odero JPR, editor. Techniques of insect rearing for the development of integrated pest and vector management strategies. ICIPE Science Press. Nairobi, Kenya. p. 449–471.
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. Science 330:622–627.
- Geerts S, Holmes PH, Eisler MC, Diall O. 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. Trends Parasitol. 17:25–28.
- Geigy R. 1948. Elevage de *Glossina palpalis*. Acta Trop. 5:201–8.

- Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F. 2010. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav. Ecol. Off. J. Int. Soc. Behav. Ecol.* 21:1087–1092.
- Hargrove JW. 2004. Tsetse population dynamics. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. *The trypanosomiasis*. Wallingford: CABI. p. 113–137. [accessed 2015 Jun 12]. <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20043124835>
- Hargrove JW. 1995. Towards a general rule for estimating the day of pregnancy of field caught tsetse flies. *Physiol. Entomol.* 20:213–223.
- Hargrove JW. 1994. Reproductive rates of tsetse flies in the field in Zimbabwe. *Physiol. Entomol.* 19:307–318.
- Hargrove JW, Coates TW. 1990. Metabolic rates of tsetse flies in the field as measured by the excretion of injected caesium. *Physiol. Entomol.* 15:157–166.
- Hursey BS, Slingenbergh J. 1995. The tsetse fly and its effects on agriculture in sub-saharan Africa. *World Anim. Rev.* 2:67–73.
- Hurvich CM, Tsai CL. 1995. Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics* 51:1077–1084.
- Itard J, Cuisance D, Tacher G. 2003. Trypanosomoses : historique - repartition géographique. In: Lefevre PC, Blancou J, Charmette R, editors. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires*. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc. p. 1607–1615.
- Itard J. 1976. L'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank, 1949 (Diptera-Muscidae) à Maisons-Alfort. *Rev. Elev. Médecine Vét. Pays Trop.* 29:43–58.
- Jack RW. 1939. *Studies in the Physiology and Behaviour of Glossina morsitans*, Westw. Rhod S, editor. Zimbabwe.
- Jackson CHN. 1949. The biology of tsetse flies. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 24:174.
- Jackson CHN. 1945. Comparative Studies of the Habitat Requirements of Tsetse Fly Species. *J. Anim. Ecol.* 14:46–51.
- Jordan AM. 1986. *Trypanosomiasis control and African rural development*. Longman, London.
- Kabayo JP. 2002. Aiming to eliminate tsetse from Africa. *Trends Parasitol.* 18:473–475.
- Klassen W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 39–68.
- Laveissière C, Grebaut P, Herder S, Penchenier L. 2000. *Les glossines vectrices de la trypanosomiose humaine africaine*. Yaoundé, Cameroun: IRD.
- Leak SGA. 1999. *Tsetse biology and ecology: Their role in the epidemiology and control of trypanosomosis*. Nairobi, Kenya: ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Mellanby H. 1937. Experimental work on reproduction in the tsetse fly, *Glossina palpalis*. *Parasitology* 29:131–141.
- Mellanby K. 1936a. Humidity and Insect Metabolism. *Nature* 138:124–125.
- Mellanby K. 1936b. Experimental work with the tsetse-fly, *Glossina palpalis*, in Uganda. *Bull. Entomol. Res.* 27:611–632.

- Mellanby K. 1932. Effects of Temperature and Humidity on the Metabolism of the Fasting Bed-Bug (*Cimex lectularius*), Hemiptera. *Parasitology* 24:419–428.
- Mutika GN, Kabore I, Parker AG, Vreysen MJB. 2014. Storage of male *Glossina palpalis gambiensis* pupae at low temperature: effect on emergence, mating and survival. *Parasit. Vectors* 7:465.
- Mutika GN, Kabore I, Seck MT, Sall B, Bouyer J, Parker AG, Vreysen MJB. 2013. Mating performance of *Glossina palpalis gambiensis* strains from Burkina Faso, Mali, and Senegal. *Entomol. Exp. Appl.* 146:177–185.
- Opiyo E, Parker AG, Mohammed AH. 2006. Standard operating procedures of mass-rearing tsetse flies. Dyck VA, editor. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.
- Pagabeleguem S, Seck MT, Sall B, Vreysen MJB, Gimonneau G, Fall AG, Bassene M, Sidibé I, Rayaisse J-B, Belem AMG, et al. 2015. Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield. *Parasit. Vectors* 8:259.
- Pagabeleguem S. 2012a. Etude de compétitivité des mâles stériles dans le cadre de l'utilisation de la technique de l'insecte stérile pour l'éradication des glossines dans la zone des Niayes au Sénégal. France - Bénin: Université de Montpellier II - Université d'Abomey Calavi.
- Pagabeleguem S, Sangaré M, Bengaly Z, Akoudjin M, Belem AMG, Bouyer J. 2012b. Climate, Cattle Rearing Systems and African Animal Trypanosomosis Risk in Burkina Faso. *PLoS ONE* 7:e49762.
- Pollock JN. 1982. Manuel de lutte contre la mouche tsé-tsé: Biologie, systématique et répartition des tsé-tsé. Rome, Italy: FAO.
- Potts WH. 1940. (i) Laboratory investigations. (ii) *G. pallidipes* in Shinyanga. *Tsetse Res Rep Tanganyika* 1935-8:48 and 39.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.1. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. [accessed 2015 May 7]. <http://www.R-project.org/>
- Rogers DJ, Randolph SE. 1986. Distribution and Abundance of Tsetse Flies (*Glossina* Spp.). *J. Anim. Ecol.* 55:1007–1025.
- Seck MT, Bouyer J, Sall B, Bengaly Z, Vreysen MJB. 2010. The prevalence of African animal trypanosomoses and tsetse presence in Western Senegal. *Parasite* 17:257–265.
- Sellin E, Bourdoiseau G, Clair M, Cuisance D, Fevrier J, Taze Y, Politzar H. 1979. Bilan de 4 années d'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank 1949 (Diptera, Muscidae) à Bobo-Dioulasso (Haute-Volta), sur animaux nourriciers (lapins, cobayes). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 32:335–345.
- Solano P, Torr SJ, Lehane MJ. 2013. Is vector control needed to eliminate gambiense human African trypanosomiasis? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3. [accessed 2015 Oct 11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728477/>
- Solano P, Kaba D, Ravel S, Dyer NA, Sall B, Vreysen MJB, Seck MT, Darbyshir H, Gardes L, Donnelly MJ, et al. 2010. Population Genetics as a Tool to Select Tsetse Control Strategies: Suppression or Eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e692.

- Therneau TM, Grambsch PM. 2000. The Cox Model. In: Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. New York, USA: Springer. (Statistics for Biology and Health). p. 39–77. [accessed 2015 May 30]. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-3294-8_3
- Touré SM. 1974. Note sur quelques particularités dans l’habitat de *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank, 1949 (Diptera, Glossinidae) observées au Sénégal. *Revue d’Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux*. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 27:81–94.
- Van den Bossche P, Rocque S de L, Hendrickx G, Bouyer J. 2010. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitol.* 26:236–243. [accessed 2014 Dec 28]
- Vanderplank FL. 1947. Experiments in the Hybridisation of Tsetse-Flies (*Glossina* a, Diptera) and the Possibility of a New Method of Control. *Trans. R. Entomol. Soc. Lond.* 98:1–18.
- Vreysen MJB, Balenghien T, Saleh KM, Maiga S, Koudougou Z, Cecchi G, Bouyer J. 2013a. Release-Recapture Studies Confirm Dispersal of *Glossina palpalis gambiensis* between River Basins in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2022.
- Vreysen MJB, Seck MT, Sall B, Bouyer J. 2013b. Tsetse flies: their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *J. Invertebr. Pathol.* 112:15–25.
- Vreysen MJB, Saleh KM, Lancelot R, Bouyer J. 2011. Factory Tsetse Flies Must Behave Like Wild Flies: A Prerequisite for the Sterile Insect Technique. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e907.
- Warnes ML, Van Den Bossche P, Chihiya J, Mudenge D, Robinson TP, Shereni W, Chadenga V. 1999. Evaluation of insecticide-treated cattle as a barrier to re-invasion of tsetse to cleared areas in northeastern Zimbabwe. *Med. Vet. Entomol.* 13:177–184.

5.2. Conclusion

Cette étude a permis de déterminer les conditions optimales d’élevage en masse des souches SEN et SENbkf. Elle a aussi montré que la survie des mouches de *G. p. gambiensis* semble être sous l’influence de la température mais pas de l’humidité relative (entre 40 à 75%) et que les trois souches résistent différemment à l’augmentation de la température. En fonction des conditions environnementales de la zone cible de lutte, la ou les souches les plus adaptées pourront être utilisées pour atteindre l’éradication. Les résultats obtenus permettront une bonne planification des futures campagnes d’éradication qui seront initiées dans le cadre de la PATTEC avec une composante TIS.

Chapitre VI : Discussion générale

6.1. Transport des pupes matures irradiées

Transporter des pupes matures irradiées sur une longue distance c.-à-d. d'un pays à un autre ou d'un continent à un autre pour mener une campagne d'éradication est une pratique nouvelle pour les glossines alors qu'elle est couramment pratiquée chez de nombreux insectes tels que les mouches de fruit (Vargas-Terán et al. 1994; Kakinohana et al. 1997). Chez les glossines, les cas, où un transport a été décrit, ont concerné soit des pupes immatures transportées pour établir une colonie ou pour des besoins d'expériences (Opiyo et al. 2006; Mutika et al. 2013), soit des mouches adultes irradiées, comme dans les cas du projet de recherche sur la TIS mené au Tchad en 1972 (Cuisance and Itard 1973) et de l'étude lâcher-recapture menée en 2004 dans le cadre de la planification de la PATTEC Mali (Vreysen et al. 2013a). En effet, pour le projet au Tchad, les adultes mâles de *G. tachinoides* (2-10 jours d'âge) avaient été élevés à Maisons-Alfort, irradiés à Saclay (France), puis transportés (dans des boîtes isothermes à 25°C) par avion à N'Djamena pour être lâchés dans un gîte naturel de la rive camerounaise du fleuve Chari (Cuisance and Itard 1973). Pour le projet au Mali, les mouches avaient été produites et irradiées à l'insectarium du CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso et transportées par avion à Bamako puis par la route aux différents points de lâchers (environ 65 km de Bamako) (Vreysen et al. 2013a). Le transport de pupes matures irradiées (les adultes étant très fragiles au transport sur de longues distances) est d'une grande importance pour les futurs programmes d'éradication de la PATTEC qui solliciteront pour la fourniture de pupes irradiées, les deux insectariums d'envergure récemment construits au Burkina Faso pour l'Afrique de l'Ouest et en Ethiopie pour l'Afrique de l'Est. Notre étude menée dans le cadre de la campagne d'éradication en cours dans la zone des Niayes au Sénégal utilisant des mâles issus de pupes provenant du Burkina Faso a permis d'identifier l'effet de différents paramètres au cours du transport sur le rendement et la qualité des mâles stériles disponibles pour la composante TIS.

Le dispositif constitué d'une boîte isotherme et des packs S8 ou PCM (Phase Change Material) a permis de maintenir la température des pupes à $10 \pm 3^\circ\text{C}$ au cours du transport, ce qui correspond à la température préconisée pour le transport des pupes matures (Mutika et al. 2014). Mais une variation de la température au-delà de cet intervalle était préjudiciable aux pupes provoquant des émergences au cours du transport, une réduction du taux d'émergence à l'arrivée et l'émergence de mouches avec des ailes déformées (Pagabeleguem et al. 2015). En plus de la fluctuation de la température à l'intérieur du colis, la baisse de la performance des

futures mouches peut aussi être due aux chocs mécaniques et aux vibrations subis par les pupes au cours du transport, ainsi qu'au stress lié au froid et aux manipulations dans les différents insectariums (pour le blocage par le froid, l'irradiation, la mise en émergence, etc.) (Pagabeleguem et al. 2015). Dans le passé, des études ont montré qu'en gardant les pupes à une température en dessous de 12°C, il était possible de bloquer leur émergence (Birkenmeyer and Dame 1975; Pollock 1982a), ce qui signifie que les émergences observées au cours du transport ont lieu lorsque la température dépasse ce seuil. Les chocs mécaniques et vibrations sont probablement responsables des mouches avec les ailes déformées, même si pour ce paramètre d'autres études sont nécessaires pour mieux en élucider les causes. Le blocage des pupes au froid ($10 \pm 3^\circ\text{C}$) semble avoir très peu d'effet sur les émergences des pupes, ce qui confirme les résultats obtenus dans les études antérieures (Mutika et al. 2002; Mutika et al. 2014). Néanmoins la durée du blocage est importante car la performance des pupes du lot 2 a toujours été meilleure que celles du lot 1 (pupes du lot 1 gardées au froid 1 jour de plus que celles du lot 2). Le pourcentage de mâles disponibles était de $63,7 \pm 14,1\%$, ce qui a été utilisé pour mettre en œuvre la phase opérationnelle d'éradication dans les Niayes avec de très bons résultats (Dicko et al. 2014). Les conditions de transport ont été améliorées avec le temps (telles que l'utilisation du coton pour les pupes du CIRDES et de la vermiculite pour celles de SAS pour amortir les chocs mécaniques), ce qui a permis d'améliorer significativement le pourcentage de mâles disponibles pour les lâchers qui atteignait 75% à la fin de l'étude.

6.2. Qualité des mâles stériles

Les résultats du protocole de contrôle qualité des mâles stériles mis en place ont montré qu'avec un petit échantillon (50 pupes par lot de 2500) il est possible de prédire avec précision la proportion de mâles stériles opérationnels pour la composante TIS dans le cadre d'une campagne d'éradication. En effet, le taux d'émergence, le taux de mouches avec des ailes déformées et la capacité d'envol étaient fortement corrélés entre les groupes qualité et témoin. Ce qui montre aussi que les procédures du protocole qualité n'ont pas d'impact négatif sur les émergences des pupes. Selon le protocole qualité, moins de 40% des pupes reçues produisaient des mâles capables de voler et donc considérés comme opérationnels pour la TIS. Cette proportion était faible par rapport à celles obtenues chez les mouches de fruit (chez lesquelles le protocole de contrôle qualité a été initialement développé) qui variaient entre 55% et 75% selon les espèces (Barry et al. 2003; Shelly et al. 2013; FAO/IAEA/USDA 2014). Cette proportion s'était nettement améliorée en 2014 et atteignant les 55% suite à l'amélioration du

système de transport rapporté au chapitre 2. De plus, ce qui est mesuré ici est la capacité des mouches à voler alors que les données qualité indiquaient qu'environ 20% des mouches qui ont émergé avaient leurs ailes déployées (c.-à-d. morphologiquement normales) mais n'ont pas pu s'échapper du tube d'envol. Lors de la récolte des données de terrain sur le taux d'envol, il est probable qu'une partie des mouches ayant volé hors du drap de lâcher l'ait fait par petits sauts et soient restés à proximité de celui-ci, sans la moindre possibilité de pouvoir compétir avec les mâles sauvages. En revanche, la compétitivité des mâles capables de voler sur le terrain était très bonne puisqu'un ratio de 2-3/1 mâles stériles/sauvage permettait de réduire de 50% la fertilité des femelles sauvages par génération (Pagabeleguem 2012a). Alors qu'une compétitivité 6 fois plus faible était estimée au niveau du fleuve Mouhoun au Burkina Faso d'où la souche est originaire c'est-à-dire un ratio de 14,4/1 pour obtenir le même résultat (50% de réduction de la fertilité des femelles sauvages) (Sow et al. 2012). La médiane de survie des mâles stériles, qui ont échappé au tube et gardés à jeun (à partir de leurs réserves de graisse), était de 6 jours, ce qui était similaire au résultat observé avec *G. pallidipes* (Mutika et al. 2002). Cette survie était bien sûr meilleure pour les mâles destinés aux lâchers car ils étaient alimentés au moins trois fois avec du sang avant d'être lâchés, ce qui augmentait leur réserve alimentaire, améliorant ainsi leur survie sur le terrain jusqu'à la rencontre d'un hôte pour se nourrir, et par conséquent leur compétitivité.

Le protocole qualité proposé présente un certain nombre d'intérêts :

- il guide dans la planification de la phase d'éradication des programmes. Après une phase de suppression, la quantité de mâles stériles à lâcher périodiquement est fonction de la densité de la population résiduelle mais surtout de la qualité des mâles (Vreysen 2001) qui peut être exprimée comme la proportion en mâles opérationnels pour la TIS. La connaissance de cette proportion permettra de définir la stratégie de lâcher à mettre en œuvre et l'estimation des besoins en pupes ou mâles stériles nécessaires pour atteindre l'éradication, donc de la taille de la colonie en insectarium qu'il faut pour répondre à ce besoin, du temps que prendront les opérations et finalement d'estimer le ratio coûts/bénéfices de la stratégie de lutte. Par exemple dans le cadre du programme en cours dans la zone des Niayes, la combinaison de ces paramètres a permis une bonne mise en œuvre des opérations de lutte qui évoluent efficacement vers l'éradication car depuis avril 2012, aucune mouche sauvage n'a été capturée dans le premier bloc du projet (FAO 2014; FAO/IAEA 2014; Feeding Knowledge 2015), avec une éradication totale dans les Niayes prévue pour fin 2016 (Dicko et al. 2014) ;

- il réduit la charge de travail et surtout améliore la qualité des mâles stériles. En effet, dans un programme d'éradication comme celui de la zone des Niayes, des milliers de mâles stériles sont lâchés par semaine, nécessitant de nombreux travaux préliminaires à l'insectarium comme la séparation, le comptage des mouches normales et anormales après les émergences, des mortalités et des mâles non envolés sur le terrain. Les données qualité ont montré que tous ces paramètres sont bien prédits à partir d'un petit échantillon de pupes ce qui permet de diminuer considérablement le poids du travail mais surtout le stress que génèrent les multiples manipulations et le temps de refroidissement important lié au tri qui réduisent la qualité des mâles ;
- il améliore les systèmes d'élevage des mouches : les critères de qualité évalués régulièrement constituent un feedback d'information aux insectariums de production et leur servent de référence pour apporter des mesures d'amélioration dans les systèmes d'élevage.

Une telle approche qualité est à mettre en place dans les futures campagnes de lutte intégrée avec une composante TIS pour plus d'efficacité.

6.3. Discrimination mâles stériles/sauvages

Comme nous l'avons dit précédemment, la lutte dans la zone des Niayes au Sénégal évolue avec efficacité vers l'éradication et des procédures existent pour pouvoir déclarer qu'un bloc ou une zone est éradiquée de mouches tsé-tsé. Il est recommandé après la capture de la dernière mouche sauvage, de poursuivre les opérations de lâchers pendant une période raisonnable (6 à 12 mois) afin d'assurer le succès de l'éradication (FAO 1996; Barclay et al. 2005). Dans le cas de l'éradication de *G. austeni* à Zanzibar, les lâchers ont été poursuivis pendant six générations (18 mois) après la capture de la dernière mouche sauvage avant de confirmer l'éradication (Vreysen et al. 2000). Ceci signifie qu'aucun doute ne doit être possible quant à la nature d'une mouche capturée (stérile ou sauvage) en phase finale d'éradication. L'outil moléculaire développé ici a montré sa fiabilité dans la discrimination entre mâles stériles et sauvages. Il constitue donc l'outil idéal à utiliser dans les campagnes d'éradication des glossines avec une composante TIS pour pouvoir déclarer qu'une zone est "éradiquée de mouche tsé-tsé". C'est une méthode qui pourrait être adaptée dans le cadre de la lutte contre d'autres types d'insectes ravageurs.

6.4. Trait de vie de glossines à différentes conditions climatiques

L'éradication prônée par la PATTEC ne peut être atteinte que par la lutte intégrée avec une composante TIS, en particulier dans le cas des glossines riveraines qui vivent dans une végétation dense et protectrice (Cuisance et al. 1984; Takken et al. 1986; Vreysen et al. 2000). Nous avons montré (chapitre 2) la faisabilité de transporter des pupes matures sur une longue distance pour conduire une campagne d'éradication (Pagabeleguem et al. 2015). De plus, l'existence de compatibilité entre des souches de *G. p. gambiensis* originaires de pays différents et la création de deux nouvelles souches (SEN et SENbkf) en plus de BKF dans le cadre du programme de lutte au Sénégal (Mutika et al. 2013) constituent des avancées pour l'utilisation de la TIS dans les futures campagnes. L'un des défis était de déterminer les conditions idéales pour l'élevage en masse de différentes souches de la même espèce, notamment pour SEN et SENbkf, puisque celles de BKF étaient déjà connues (Opiyo et al. 2006), et le choix de la souche la plus adaptée à des conditions environnementales données. Nous avons pu montrer que ces conditions optimales correspondaient à $24,6 \pm 1^\circ\text{C}$ et $23,9 \pm 1^\circ\text{C}$ pour SENbkf et SEN respectivement. Sachant que la relation entre les glossines et le climat est complexe (Buxton 1955), les expériences conduites allant dans ce sens ont pu montrer que la survie des mouches était sous influence de la température et non de l'humidité relative (entre 40 et 75%). Des travaux antérieurs menés sur la même espèce indiquaient des résultats similaires (Mellanby 1936). De plus, le niveau de résistance à de fortes températures était différent d'une souche à une autre. En effet, les tsé-tsé ont un système de régulation de perte d'eau qui leur permet de réduire leur température interne lorsque la température ambiante s'élève mais cette capacité de régulation varie d'une espèce à une autre (Buxton 1955; Leak 1999; Laveissière et al. 2000), voir d'un écotype à un autre, comme nous l'avons démontré ici. Très récemment, une étude a montré que les populations sauvages d'où sont originaires les souches SEN et BKF étaient fortement divergentes et pouvaient être considérées comme des sous-espèces (De Meeûs et al. 2015). Ceci pourrait être à l'origine de leur différence en capacité de régulation de la température interne même si en terme de colonisation, BKF est élevée depuis 40 ans (Bauer et al. 1984) alors que SEN et SENbkf ont été colonisées il y a seulement 5 ans (Mutika et al. 2013). Nous avons observé qu'à des températures élevées, les mouches mourraient rapidement, avec une médiane de survie de quatre et deux jours seulement à 30°C et 35°C respectivement. Il est évident que dans le cadre d'une campagne de lutte avec des lâchers de mâles stériles dans une zone où la température serait $>30^\circ\text{C}$ (surtout en saison sèche), la survie serait meilleure sur le terrain par rapport à ce que nous avons observé. Cette différence s'expliquerait par le fait que

sur le terrain, les mouches arrivent à minimiser les effets des températures extrêmes en se réfugiant dans des microclimats favorables (plus frais de 2 à 6°C) (Hargrove 1995), ce qui fait que la température réellement subie par les mouches sur le terrain est généralement différente de la température ambiante.

Cette étude suggère qu'en fonction des conditions environnementales d'une zone ou d'un pays cible de lutte contre *G. p. gambiensis*, la ou les souches les plus adaptées devraient être utilisées pour atteindre l'éradication. Sur le plan biologique, il est nécessaire de combiner à ce choix la compétitivité de chaque souche dans différentes conditions climatiques.

Conclusions et perspectives

Cette thèse a permis d'obtenir des résultats qui donnent de nouvelles orientations quant à la lutte contre les mouches tsé-tsé, notamment dans sa phase d'éradication, et qui permettent d'améliorer significativement le coût-efficacité de la TIS.

L'étude sur le transport des pupes a montré qu'il est possible de transporter des pupes matures irradiées de glossines élevées dans un site distant et de conduire un programme d'éradication avec succès dans la zone des Niayes au Sénégal où l'éradication totale est prévue pour fin 2016. Cette pratique permettra de gagner en coût-efficacité-temps dans la lutte contre les glossines car elle évite de construire un insectarium dans chaque site de lutte pour la production en masse, ce qui s'avère très coûteux (en temps et en personnel dédié). Avec les deux insectariums d'envergure construits dans le cadre de la PATTEC, les données collectées dans cette étude seront utilisées pour satisfaire les besoins en mâles stériles des futurs programmes d'éradication.

La qualité des mâles stériles est un paramètre crucial pour la réussite d'un programme d'éradication (Vreysen 2001; Calkins and Parker 2005). Le protocole de contrôle qualité développé dans cette thèse a permis de prédire avec certitude la qualité des mâles stériles lâchés sur le terrain. C'est donc un bon outil qui guidera dans la planification et le suivi continu de la phase d'éradication des campagnes PATTEC. Les résultats de ce contrôle qualité ont été communiqués aux deux insectariums d'origine, ce qui a permis d'améliorer les systèmes d'élevage et le dispositif de conditionnement - transport des pupes.

Pendant la phase opérationnelle d'éradication, déterminer le moment où la dernière mouche sauvage est capturée est un paramètre crucial permettant de savoir pendant combien de temps il faudra continuer les lâchers avant de déclarer la zone éradiquée de mouches tsé-tsé. Nous avons dans cette thèse mis au point un outil moléculaire de discrimination fiable entre mâles stériles et sauvages, ce qui permet d'éviter toute erreur d'identification quant à la nature des mouches capturées pendant la phase d'éradication.

Les expériences relatives aux traits de vie de glossines à différentes conditions de température et d'humidité relative, nous ont permis de déterminer les conditions optimales d'élevage en masse de deux nouvelles souches de *G. p. gambiensis* (SEN et SENbkf) et de confirmer celles de BKF. Par ailleurs, l'étude a montré que le niveau de résistance à des températures élevées était différent d'une souche à une autre. Ces résultats permettront d'optimiser les futures

campagnes d'éradication en choisissant la souche de glossine la plus adaptée aux conditions environnementales de la zone cible d'éradication.

Néanmoins, ce travail n'a pas été sans limites. En effet, pour la discrimination entre mâles stériles et mâles sauvages, le séquençage a été fait sur des échantillons dont la concentration du produit PCR purifié $> 8 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Ce qui veut dire que certains échantillons n'ont pas pu être séquencés juste parce qu'ils ne répondaient pas à cette norme de concentration et cela constitue une limite de l'outil car ces mouches demeureront toujours douteuses. Cette situation est d'avantage liée au mode de conservation des échantillons. Pour cela, nous recommandons de reprendre les expériences tout en conservant les têtes des mouches dans de l'alcool 70% plutôt que de les coller sur un papier et garder à la température ambiante. En outre, pour l'étude sur les traits de vie des trois souches de glossines à différentes conditions climatiques, quelques limites ont été relevées. Sur le plan technique, disons que l'insectarium du CIRAD dans lequel les expériences ont été menées a connu une extension/réfection et nos expériences ont été les premières à être menées dans les salles climatiques. Au cours de ces expériences, la température et l'humidité relative de deux salles n'ont pas été stables et variaient au-delà des consignes théoriques. Cette situation était certainement liée à un manque d'étanchéité des murs de ces salles car les variations étaient observées à chaque fois qu'il pleuvait. Une autre insuffisance à cette activité a été la détermination des paramètres de fécondité par série et non par femelle. En effet, la collecte des pupes a été faite par série et la détermination des durées pour la production de la première larve et de l'intervalle interlarvaire ont été faites par estimation à partir de modèles alors qu'elles pouvaient être déterminées avec précision si le suivi s'était fait par femelle. Ce suivi individuel demandera encore plus du travail, mais donnera des résultats qui seront plus fiables.

Si les résultats de ces travaux permettent d'ores et déjà d'optimiser l'utilisation de la TIS dans la lutte contre les glossines, quelques points méritent encore d'être étudiés pour garantir sa réussite.

L'existence de mouches avec des ailes déformées parmi les émergences après le transport (10-12%) réduit les quantités en mâles utilisables pour la TIS alors que dans les insectariums d'origine, ces malformations sont rarement rencontrées (Rayaissé JB et Takac P, com. pers.). Dès lors, une investigation est nécessaire pour en déterminer la cause afin de proposer des mesures correctives. De plus, nous avons montré que des pupes complètement développées sont très sensibles aux manipulations. Il serait alors intéressant de tester le système de sexage des pupes avec les appareils de classification des pupes de glossines par sexe ("Infra-red sorter") grâce

à leur absorbance d'infrarouge. Son efficacité a déjà été démontrée avec des pupes *G. pallidipes* où la différence est très significative à 5 jours avant leur émergence (Dowell et al. 2005). L'application de cette technique nous permettra d'une part d'avoir 100% de pupes mâles à irradier et d'autre part de travailler avec des pupes jeunes (moins de trois semaines d'âge) pour réduire les stress de manipulation.

Le pourcentage de 55% de mâles opérationnels pour la TIS obtenu à la fin des expériences suite à l'amélioration des conditions de transport semble suffisant pour démarrer une phase opérationnelle d'éradication, mais pourrait être nettement amélioré. La mise en place de ce protocole de contrôle qualité dans les insectariums d'origine permettra de comparer les paramètres qualité obtenus sur des pupes prélevées avant et après le transport afin d'identifier les différents paramètres potentiellement responsables de la faible quantité des mâles capables de voler et d'apporter des mesures correctives.

Au-delà de la survie dans différentes conditions climatiques au laboratoire, l'étude de la survie, de la dispersion et de la compétitivité des trois souches de *G. p. gambiensis* en milieu réel et dans différentes conditions environnementales nous aidera à affiner le choix de la ou des souches les plus adaptées pour telle ou telle zone cible d'éradication. De plus, cette étude n'a pas pu révéler l'effet de la température sur la fécondité des trois souches du fait d'un incrément trop grand (5°C). Les températures optimales pour l'élevage en masse de SEN et SENbkf ont donc été déterminées sur la base de leur survie. Alors que la fécondité des tsé-tsé notamment les durées pour la production de la première larve et de l'intervalle interlarvaire sont influencées par la température (Harley 1968; Hargrove 2004; Childs 2011). Il nous semble nécessaire de conduire d'autres expériences sur l'intervalle 23-28°C (75% HR) avec un incrément plus petit (c.-à-d. 1°C) afin de mettre en évidence l'effet de la température sur la fécondité des trois souches de *G. p. gambiensis*. La combinaison de ces résultats avec ceux de la survie nous guidera dans la détermination des conditions optimales d'élevage en masse de SEN et SENbkf. Par ailleurs, le comportement observé des glossines vis-à-vis de la variation de la température nous ouvre d'autres voies d'investigations notamment sur la compétence vectorielle des glossines vis-à-vis de différentes espèces de trypanosomes et dans différentes conditions de température. Ceci permettra de développer des modèles spatio-temporels de risque trypanosomien en fonction des conditions environnementales et des paramètres entomologiques comme la densité apparente, les espèces de glossines et de trypanosomes impliquées.

Ces travaux menés sur l'espèce *G. p. gambiensis* devront être étendus à d'autres espèces de glossines pour permettre à la PATTEC d'atteindre son objectif qui est de libérer le continent africain des mouches tsé-tsé.

Liste des publications

Soumaïla Pagabeleguem, Momar Talla Seck, Baba Sall, Marc JB Vreysen, Geoffrey Gimonneau, Assane Gueye Fall, Mireille D. Bassene, Issa Sidibé, Jean-Baptiste Rayaissé, Adrien M.G. Belem and Jérémy Bouyer (2015). Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield. *Parasit. Vectors* 8, 259.

Momar Talla Seck[¶], **Soumaïla Pagabeleguem**[¶], Mireille D. Bassene, Assane Gueye Fall, Therese A.R. Diouf, Baba Sall, Marc JB Vreysen, Jean-Baptiste Rayaissé, Peter Takac, Issa Sidibé, Andrew Parker, Gratian N. Mutika, Jérémy Bouyer and Geoffrey Gimonneau (2015). Quality of sterile male tsetse after long distance transport as chilled, irradiated pupae. *PLoS Negl Trop Dis* 9(11): e0004229. doi:10.1371/journal.pntd.000422.

Soumaïla Pagabeleguem, Geoffrey Gimonneau, Momar Talla Seck, Marc JB Vreysen, Baba Sall, Issa Sidibé, Jean-Baptiste Rayaissé, Jérémy Bouyer and Sophie Ravel (2015). A molecular method to discriminate between sterile and wild tsetse flies during eradication programmes that have a sterile insect technique component. *En revision mineure à PLOS Negl Trop Dis*.

Soumaïla Pagabeleguem, Sophie Ravel, Ahmadou H. Dicko, Marc JB Vreysen, Andrew Parker, Peter Taback, Karine Huber, Issa Sidibé, Geoffrey Gimonneau, Jérémy Bouyer (2015). The influence of temperature and relative humidity on survival and fecundity of three *Glossina palpalis gambiensis* strains, *Prêt à être soumis à Behavioral Ecology*.

Communications orales

Pagabeleguem S, Gimonneau G, Seck MT, Sall B, Vreysen MJ, Fall AG, Bassene M, Sidibé I, Rayaissé JB, Belem AM, Bouyer J. Eradication des glossines dans la zone des Niayes au Sénégal par la technique de l'insecte stérile à partir d'une souche de mâles stériles du Burkina Faso : compétitivité, survie et dispersion. Journées scientifiques de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 06-09 mai 2014.

Pagabeleguem S, Seck MT, Sall B, Vreysen MJ, Fall AG, Bassene M, Sidibé I, Rayaissé JB, Belem AM, Gimonneau G, Bouyer J. Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae: sterile male yield, adult flight ability and survival. 33^e conférence CSIRLT, N'Djamena, Tchad, 14-18 septembre 2015.

Ateliers de formation

- Sécurité des sources radioactives, AIEA/ARSN, Ouagadougou, Burkina Faso, 18-22 août 2014.
- Recherche et gestion de l'information : méthodes, outils, ressources en Santé/Sciences, Collège Doctoral Languedoc Roussillon, Montpellier, 7-9 avril 2014.
- Communication écrite/Ecrit académique, CFLE-IAMM, Montpellier, mars-avril 2014.
- Pédagogie universitaire : Dynamique de groupes et relation pédagogique, Montpellier, février-mars 2014.
- Construire un article scientifique, CIRAD Baillarguet, Montpellier, 17-18 mars 2014.
- Initiation et perfectionnement sur ArcGis 10, IRD et partenaires, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 15-20 octobre 2013.
- Planification et la mise en œuvre des projets PATTEC, l'Ecole de Lutte Anti Tsé-tsé (ELAT), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, organisé par UA-PATTEC, 17-27 octobre 2012.
- Rédaction scientifique, communication scientifique et plaidoyer politique, CTA/RUFORUM, Entebbe, Ouganda, 24-28 septembre 2012.
- Génétique des populations empiriques, IRD, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 10-13 septembre 2012.

Références bibliographiques

- Abd-Alla AMM, Marin C, Parker AG, Vreysen MJB. 2014. Antiviral drug valacyclovir treatment combined with a clean feeding system enhances the suppression of salivary gland hypertrophy in laboratory colonies of *Glossina pallidipes*. *Parasites & Vectors* 7:214.
- Abd-Alla AMM, Kariithi HM, Mohamed AH, Lapiz E, Parker AG, Vreysen MJB. 2013. Managing Hytrosavirus Infections in *Glossina pallidipes* Colonies: Feeding Regime Affects the Prevalence of Salivary Gland Hypertrophy Syndrome. *PLoS ONE* 8:e61875.
- Abd-Alla AMM, Adun H, Parker AG, Vreysen MJB, Bergoin M. 2012. The Antiviral Drug Valacyclovir Successfully Suppresses Salivary Gland Hypertrophy Virus (SGHV) in Laboratory Colonies of *Glossina pallidipes*. *PLoS ONE* 7:e38417.
- Abd-Alla AMM, Kariithi HM, Parker AG, Robinson AS, Kiflom M, Bergoin M, Vreysen MJB. 2010. Dynamics of the salivary gland hypertrophy virus in laboratory colonies of *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Virus Research* 150:103–110. [accessed 2014 Feb 20]
- Adam Y, Bouyer J, Dayo G-K, Mahama CI, Vreysen MJB, Cecchi G, Abd-Alla AMM, Solano P, Ravel S, De Meeûs T. 2014. Genetic comparison of *Glossina tachinoides* populations in three river basins of the Upper West Region of Ghana and implications for tsetse control. *Infect Genet Evol* 28:588–595.
- Adam Y, Cecchi G, Kgori PM, Marcotty T, Mahama CI, Abavana M, Anderson B, Paone M, Mattioli RC, Bouyer J. 2013. The sequential aerosol technique: A major component in an integrated strategy of intervention against riverine tsetse in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2135.
- Adam Y, Marcotty T, Cecchi G, Mahama CI, Solano P, Bengaly Z, Van den Bossche P. 2012. Bovine trypanosomosis in the Upper West Region of Ghana: Entomological, parasitological and serological cross-sectional surveys. *Res Vet Sci* 92:462–468.
- Aksoy S. 2000. Tsetse-A haven for microorganisms. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 16:114–118.
- Alam U, Medlock J, Brelsfoard C, Pais R, Lohs C, Balmand S, Carnogursky J, Heddi A, Takac P, Galvani A, et al. 2011. Wolbachia Symbiont Infections Induce Strong Cytoplasmic Incompatibility in the Tsetse Fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathog* 7:e1002415.
- Amsler S, Filledier J, Millogo R. 1994. Efficacité comparée de différents pièges pour la capture de *Glossina tachinoides* (Diptera : Glossinidae) au Burkina Faso. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 47:207–2014.
- Anderson E. 1949. Introgressive hybridization. :ix + 109 pp.
- Authié E, Boulangé A, Muteti D, Lalmanach G, Gauthier F, Musoke AJ. 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *Int J Parasitol* 31:1429–1433.
- Authié E, Duvallet G, Robertson C, Williams DJ. 1993. Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to ‘trypanotolerance’ in cattle. *Parasite Immunol* 15:465–474.
- Barclay HJ, Hargrove JW, Clift A, Meats A. 2005. Procedures for Declaring Pest Free Status. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile Insect Technique*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 363–386. [accessed 2015 Oct 7]. http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4051-2_13

- Barry JD, Blessinger T, Morse JG. 2004. Recapture of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in California's Preventative Release Program. *J. Econ. Entomol.* 97:1554–1562.
- Barry JD, McInnis DO, Gates D, Morse JG. 2003. Effects of irradiation on mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae): Emergence, survivorship, lure attraction, and mating competition. *J Econ Entomol* 96:615–622.
- Bauer B, Amsler-Delafosse S, Clausen PH, Kabore I, Petrich-Bauer J. 1995. Successful application of deltamethrin pour on to cattle in a campaign against tsetse flies (*Glossina* spp.) in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Trop Med Parasitol* 46:183–189.
- Bauer B, Filledier J, Kabore I. 1984. Large scale rearing of tsetse flies (Diptera, Glossinidae) in the C.R.T.A. Bobo-Dioulasso, Burkina based on in vitro feeding techniques. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 37:9–17.
- Baumhover AH, Graham AJ, Bitter BA, Hopkins DE, New WD, Dudley FH, Bushland RC. 1955. Screwworm control through release of sterilized flies. *Journal of Economic Entomology* 48:462–466.
- Belemsaga DMA. 2001. La trypanotolérance. In: Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et de leurs vecteurs. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso: CIRAD-EMVT / CIRDES. p. 113–121.
- Bengaly Z. 2003. Pathogénicité comparée de 3 types phylogénétiques distincts de l'espèce *Trypanosoma congolense* [Thèse de doctorat es sciences]. [Burkina Faso]: Université de Ouagadougou, UFR/SVT.
- Birkenmeyer DR, Dame DA. 1975. Storage and sexual separation of *Glossina morsitans morsitans* Westwood puparia. *Ann Trop Med Parasitol* 69:399–405.
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Di Genua C, Failloux A-B, Sinkins SP. 2013. A Wolbachia wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 7. [accessed 2014 Feb 19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610642/>
- Bonomi A, Bassetti F, Gabrieli P, Beadell J, Falchetto M, Scolari F, Gomulski LM, Regazzini E, Ouma JO, Caccone A, et al. 2011. Polyandry Is a Common Event in Wild Populations of the Tsetse Fly *Glossina fuscipes fuscipes* and May Impact Population Reduction Measures. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1190. [accessed 2013 Nov 9]
- Bouyer F, Seck MT, Dicko AH, Sall B, Lo M, Vreysen MJB, Chia E, Bouyer J, Wane A. 2014. Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3112.
- Bouyer J, Bouyer F, Donadeu M, Rowan T, Napier G. 2013a. Community- and farmer-based management of animal African trypanosomosis in cattle. *Trends Parasitol* 29:519–522.
- Bouyer J, Seck MT, Sall B. 2013b. Misleading guidance for decision making on tsetse eradication: response to Shaw et al. (2013). *Prev Vet Med* 112:443–446.
- Bouyer J, Seck MT, Sall B, Ndiaye EY, Guerrini L, Vreysen MJB. 2010a. Stratified Entomological Sampling in Preparation for an Area-Wide Integrated Pest Management Program: The Example of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the Niayes of Senegal. *J Med Entomol* 47:543–552.

- Bouyer J, Solano P, Cuisance D, Itard J, Frézil JL, Authié E. 2010b. Trypanosomosis: Control methods. In: Lefevre PC, Blancou J, Chermette J, Uilenberg G, editors. infectious and parasitic diseases of livestock. Lavoisier (Tec & Doc). Paris, France. p. 1936–1943.
- Bouyer J. 2006. Ecologie des glossines du Mouhoun au Burkina Faso : intérêt pour l'épidémiologie et le contrôle des trypanosomoses africaines [PhD]. [Montpellier, France]: Université de Montpellier II.
- Budd LT. 1999. DFID-Funded Tsetse and Trypanosomosis Research and Development Since 1980. United Kingdom: Department of International Development.
- Bushland RC. 1985. Eradication program in the southwestern United States. In: Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. O. H. Graham. (Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America). p. 12–15.
- Buxton PA. 1955. The natural history of tsetse flies. An account of the biology of the genus *Glossina* (Diptera). London, UK: London School of Hygiene and Tropical Medicine.
- Caceres C, Cayol JP, Enkerlin W, Franz G, Hendrichs J, Robinson AS. 2004. Comparison of Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) (Tephritidae) bisexual and genetic sexing strains: development, evaluation and economics. Isteg Scientific Publications. p. 367–381.
- Calkins CO, Parker AG. 2005. Sterile insect quality. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 269–296.
- Challier A, Laveissière C. 1973. Un nouveau piège pour la capture des glossines (*Glossina*: Diptera, Muscidae): description et essais sur le terrain. Cahier O.R.S.T.O.M., série Entomologie médicale et Parasitologie 10:251–262.
- Cheng Q, Ruel TD, Zhou W, Moloo SK, Majiwa P, O'Neill SL, Aksoy S. 2000. Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. Medical and Veterinary Entomology 14:44–50. [accessed 2014 Feb 17]
- Childs SJ. 2011. Theoretical levels of control as a function of mean temperature and spray efficacy in the aerial spraying of tsetse fly. Acta Trop 117:171–182.
- Courtin F, Rayaissé J-B, Tamboura I, Serdébégogo O, Koudougou Z, Solano P, Sidibé I. 2010. Updating the Northern Tsetse Limit in Burkina Faso (1949–2009): Impact of Global Change. Int J Environ Res Public Health 7:1708–1719.
- Cuisance D, Itard J, Desquesnes M, Frézil JL, Rocque SDL. 2003. Trypanosomoses : epidemiologie. In: Lefevre PC, Blancou J, Charmette R, editors. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires. Paris: Lavoisier Tec et Doc. p. 1627–1650.
- Cuisance D, Politzar H, Mérot P, Tamboura I. 1984. Les lâchers de mâles irradiés dans la campagne de lutte intégrée contre les glossines dans la zone pastorale de Sidéradougou, Burkina Faso. Rev Elev Med Vet Pays Trop 37:449–467.
- Cuisance D, Itard I. 1973. Comportement de mâles stériles de *Glossina tachinoides* West. lâchés dans les conditions naturelles aux environs de Fort-Lamy (Tchad): Transport, lâchers, rythme d'activité, action sur la population sauvage. Rev Elev Med Vet Pays Trop 26:55–76.
- De La Rocque S, Cuisance D. 2005. La tsé-tsé : une mouche singulière et dangereuse. Insecte numéro 136:27–31.

- De Meeûs T, Bouyer J, Ravel S, Solano P. 2015. Ecotype Evolution in *Glossina palpalis* Subspecies, Major Vectors of Sleeping Sickness. Caccone A, editor. PLoS Negl Trop Dis 9:e0003497.
- De Meeûs T, Ravel S, Rayaisse J-B, Kaba D, Courtin F, Bouyer J, Dayo G-K, Camara M, Solano P. 2014. Genetic correlations within and between isolated tsetse populations: What can we learn? Acta Trop 138:S6–S11.
- De Meeûs T, Ravel S, Rayaisse J-B, Courtin F, Solano P. 2012. Understanding local population genetics of tsetse: The case of an isolated population of *Glossina palpalis gambiensis* in Burkina Faso. Infect Genet Evol 12:1229–1234.
- Desquesnes M, Biteau-Coroller F, Bouyer J, Dia ML, Foil L. 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. Int J Parasitol 39:333–346.
- Desquesnes M, Dia ML. 2003. Trypanosoma vivax: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. Exp Parasitol 103:35–43.
- Dicko AH, Lancelot R, Seck MT, Guerrini L, Sall B, Lo M, Vreysen MJB, Lefrancois T, Fonta WM, Peck SL, et al. 2014. Using species distribution models to optimize vector control in the framework of the tsetse eradication campaign in Senegal. PNAS 111:10149–10154.
- Doudoumis V, Alam U, Aksoy E, Abd-Alla AMM, Tsiamis G, Brelsfoard C, Aksoy S, Bourtzis K. 2013. Tsetse-Wolbachia symbiosis" Comes of age and has great potential for pest and disease control. Journal of Invertebrate Pathology 112:94–103.
- Doudoumis V, Tsiamis G, Wamwiri F, Brelsfoard C, Alam U, Aksoy E, Dalaperas S, Abd-Alla A, Ouma J, Takac P, et al. 2012. Detection and characterization of Wolbachia infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). BMC Microbiology 12:S3. [accessed 2014 Feb 18]
- Dowell FE, Parker AG, Benedict MQ, Robinson AS, Broce AB, Wirtz RA. 2005. Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. Bulletin of Entomological Research 95:249–257.
- Dowell RV, Siddiqui IA, Meyer F, Spaugy EL. 2000. Mediterranean fruit fly preventative release programme in southern California. In: Tan KH, editor. Proceedings: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests. International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, and the 5th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 28 May–5 June 1998. Penerbit Universiti Sains Malaysia. Penang, Malaysia. p. 369–375.
- Dyck VA, Graham SH, Bloem KA. 1993. Implementation of the sterile insect release programme to eradicate the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae), in British Columbia, Canada. In: Proceedings: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. FAO/IAEA International Symposium, 19–23 October 1992, Vienna, Austria. STI/PUB/909 ed. Vienna, Austria: IAEA. p. 285–298.
- Dyer NA, Lawton SP, Ravel S, Choi KS, Lehane MJ, Robinson AS, Okedi LM, Hall MJR, Solano P, Donnelly MJ. 2008. Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the palpalis group. Mol Phylogenet Evol 49:227–239.

- Esterhuizen J, Rayaisse JB, Tirados I, Mpiana S, Solano P, Vale GA, Lehane MJ, Torr SJ. 2011. Improving the Cost-Effectiveness of Visual Devices for the Control of Riverine Tsetse Flies, the Major Vectors of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1257.
- FAO. 2014. Senegal nears first victory in war on tsetse fly. [accessed 2015 Sep 2]. <http://www.fao.org/news/story/en/item/211898/icode/>
- FAO. 2005. La cooperación Italy. internacional en el control, erradicación y prevención del gusano barrenador del ganado. Rome, Italy: FAO.
- FAO. 2002. Twenty-second Regional Conference for Africa. Programme against African Trypanosomiasis (PAAT), Cairo, Egypt, 4-8 February 2002. Cairo, Egypt Report No.: ARC/02/REP.
- FAO. 1996. Requirements for the establishment of pest free areas. International standards for phytosanitary measures, Part 4 – Pest surveillance. Publication Number 4. Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome, Italy: FAO Report No.: 4.
- FAO/IAEA. 2014. How the FAO and IAEA are assisting the Government of Senegal in its efforts to eradicate tsetse from the Niayes area - Stories, NAFA. [accessed 2015 Sep 2]. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/news/2014-tsetse-senegal.html>
- FAO/IAEA/USDA. 2014. Product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies, version 6.0. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.
- Feeding Knowledge. 2015. Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* from the Niayes in Senegal - Eradication of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* from the Niayes in Senegal. [accessed 2015 Sep 2]. https://www.feedingknowledge.net/02-search/-/bsd/6402/en_GB
- Feldmann U. 1994. Guidelines for the rearing of tsetse flies using the membrane feeding technique. In: Ochieng'-Odero JPR, editor. Techniques of insect rearing for the development of integrated pest and vector management strategies. ICIPE Science Press. Nairobi, Kenya. p. 449–471.
- Feldmann U, Dyck VA, Mattioli RC, Jannin J. 2005. Potential impact of tsetse fly control involving the sterile insect technique. In: Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area- Wide Integrated Pest Management. Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Springer, Dordrecht, The Netherlands). p. 701–723.
- Fox RGR, Mmbando SO, Fox MS, Wilson A. 1993. Effect on herd health and productivity of controlling tsetse and trypanosomosis by applying deltamethrin to cattle. *Trop Anim Health Prod* 25:203–214.
- Geerts S, Holmes PH, Eisler MC, Diall O. 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol* 17:25–28.
- Geiger A, Ravel S, Mateille T, Janelle J, Patrel D, Cuny G, Frutos R. 2007. Vector competence of *Glossina palpalis gambiensis* for *Trypanosoma brucei* s.l. and genetic diversity of the symbiont *Sodalis glossinidius*. *Mol. Biol. Evol.* 24:102–109.
- Geiger A, Ravel S, Frutos R, Cuny G. 2005. *Sodalis glossinidius* (Enterobacteriaceae) and Vectorial Competence of *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina morsitans morsitans* for *Trypanosoma congolense* Savannah Type. *Curr Microbiol* 51:35–40. [accessed 2014 Feb 17]

- Glaser RL, Meola MA. 2010. The Native Wolbachia Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. PLoS ONE 5:e11977. [accessed 2014 Feb 20]
- Gooding RH, Solano P, Ravel S. 2004. X-chromosome mapping experiments suggest occurrence of cryptic species in the tsetse fly *Glossina palpalis palpalis*. Can J Zool 82:1902–1909.
- Gouteux J-P, Artzrouni M, Jarry M. 2001. A density-dependent model with reinvasion for estimating tsetse fly populations (Diptera: Glossinidae) through trapping. Bulletin of Entomological Research 91:177–183.
- Gouteux J-P, Dagnogo M. 1985. Homogénéité morphologique des genitalia mâles de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Muscidae) en Côte d'Ivoire. Entomol. Med. Parasitol. 23:55–59.
- Green CH. 1994. Bait methods for tsetse fly control. Adv. Parasitol. 34:229–291.
- Hamidou Soumana I, Simo G, Njiokou F, Tchicaya B, Abd-Alla AMM, Cuny G, Geiger A. 2013. The bacterial flora of tsetse fly midgut and its effect on trypanosome transmission. J Invertebr Pathol 112:S89–S93.
- Hargrove JW. 2004. Tsetse population dynamics. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. The trypanosomiasis. Wallingford: CABI. p. 113–137. [accessed 2015 Jun 12]. <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20043124835>
- Hargrove JW, Omolo S, Msalilwa JSI, Fox B. 2000. Insecticide-treated cattle for tsetse control: the power and the problems. Med Vet Entomol 14:123–130.
- Hargrove JW. 1995. Towards a general rule for estimating the day of pregnancy of field caught tsetse flies. Physiol Entomol 20:213–223.
- Hargrove JW. 1994. Reproductive rates of tsetse flies in the field in Zimbabwe. Physiological Entomology 19:307–318.
- Harley JMB. 1968. The influence of temperature on reproduction and development in four species of *Glossina* (Diptera: Muscidae). Proc R Soc Lond [Entomol] 43:170–177.
- Harrison RG, Larson EL. 2014. Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. J. Hered. 105:795–809.
- Hendrichs J, Vreysen MJB, Enkerlin WR, Cayol JP. 2005. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 563–600.
- Hendrichs J, Ortiz J, Liedo P, Schwarz A. 1983. Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. In: Cavalloro R, editor. Proceedings, Symposium: Fruit Flies of Economic Importance. CEC/IOBC International Symposium, 16–19 November 1982, Athens, Greece. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands. p. 353–365.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, et al. 2011. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature 476:454–457.
- Hursey BS, Slingenbergh J. 1995. The tsetse fly and its effects on agriculture in sub-saharan Africa. World Anita. Rev. 84:67–73.
- IAEA. 2003. Automation for tsetse mass rearing for use in sterile insect technique programmes. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.

- ISRA/LNERV. 2014. Projet de lutte contre la mouche tsé-tsé et la trypanosomose dans la zone des Niayes. Dakar, Sénégal: Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches vétérinaires.
- Itard I, Cuisance D, Tacher G. 2003a. Trypanosomoses: historique: répartition géographique. In: Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et Région Chaudes. Paris, France: Lefèvre PC, Blancou J, and Chermette R. p. 1607–1615.
- Itard J, Cuisance D. 2003b. Vecteurs cycliques des trypanosomoses. In: Lefevre PC, Blancou J, Charmette R, editors. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. généralités, maladies virales. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc. p. 139–165.
- Itard J. 2000. Les trypanosomoses animales africaines. In: Chartier C, Itard J, Morel PC, Troncy PM, editors. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Editions médicales internationales. Paris, France: Lavoisier Tec et Doc. p. 206-450.
- Itard J. 1984. Élevage des glossines. Synthèse. Rev Elev Med Vet Pays Trop 37:143–175.
- Itard J. 1981. Pathologie des trypanosomoses animales. In: Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Tome II: Manuels de précis d'élevage N°10 (p 305-469). IEMVT. p. 381–390.
- Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J, Kaba D, Koffi M, Solano P, Garcia A, Courtin D, Laveissière C, Lingue K, et al. 2012. Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei* gambiense Are Not 100% Fatal. PLoS Negl Trop Dis 6. [accessed 2015 Sep 30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3373650/>
- Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. 2014. The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. Viruses 6:4294–4313.
- Jura DWGZO, Otieno LH, Chimtawi MMB. 1989. Ultrastructural evidence for trans-ovum transmission of the DNA virus of tsetse, *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). Current Microbiology 18:1–4.
- Kabayo JP. 2002. Aiming to eliminate tsetse from Africa. Trends Parasitol 18:473–475.
- Kaboré I. 2003. Lutte contre les vecteurs : Technique de piégeage des glossines. In: Cours international sur les maladies vectorielles tenu du 31 mars au 17 avril 2003. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso: CIRDES. p. 77–79.
- Kaboré J, De Meeûs T, Macleod A, Ilboudo H, Capewell P, Camara M, Gaston Belem AM, Bucheton B, Jamonneau V. 2013. A protocol to improve genotyping of problematic microsatellite loci of *Trypanosoma brucei* gambiense from body fluids. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 20:171–176.
- Kakinohana H, Kuba H, Kohama T, Kinjo K, Taniguchi M, Nakamori H, Tanahara A, Sokei Y. 1997. Eradication of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett, by Mass Release of Sterile Flies in Okinawa Prefecture, Japan. JARQ 2:91–100.
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. 2009. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. Science 326:134–136. [accessed 2014 Feb 19]
- Kennedy PGE. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). Lancet Neurol 12:186–194.
- Kennedy PGE. 2008. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). Ann Neurol 64:116–126.

- Kgori PM, Modo S, Torr SJ. 2006. The use of aerial spraying to eliminate tsetse from the Okavango Delta of Botswana. *Acta Trop* 99:184–199.
- Klassen W. 1989. Eradication of introduced arthropod pests: theory and historical practice. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 73:1–29.
- Klassen W. 2005a. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p. 39–68.
- Klassen W, Curtis CF. 2005b. History of the Sterile Insect Technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile Insect Technique*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. p. 3–36. [accessed 2014 Oct 8]. http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4051-2_1
- Knols BG, Willemse L, Flint S, Mate A. 1993. A trial to control the tsetse fly, *Glossina morsitans centralis*, with low densities of odour-baited targets in west Zambia. *Med. Vet. Entomol.* 7:161–169.
- Koffi M, De Meeûs T, Séré M, Bucheton B, Simo G, Njiokou F, et al. 2015. Population Genetics and Reproductive Strategies of African Trypanosomes: Revisiting Available Published Data. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003985. doi:10.1371/journal.pntd.0003985.
- Krafsur ES, Hightower BG. 1979. Field Tests of Sterile Screwworm Flies, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), Against Natural Populations in Three Coastal Areas of Mexico. *Journal of Medical Entomology* 16:33–42.
- Kuba H, Kohama T, Kakinohana H, Yamagishi M, Nakamoto Y. 1996. The successful eradication programs of the melon fly in Okinawa. In: McPheron BA, Steck GJ, editors. *Fruit fly pests. A world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press. Delray Beach, FL, USA. p. 543–550.
- Launois M, Charbonnier G, Laveissière G, Cuisance D, Duvallet G. 2004. *La mouche tsé-tsé pédagogique*. Montpellier, France: CIRAD (Les Savoirs partagés).
- Laveissière C, Garcia A, Sané B. 2003. *Lutte contre la maladie du sommeil et soins de santé primaire*. 1ère édition. Montpellier, France: IRD (Didactique). [accessed 2015 May 17]. <http://www.editions.ird.fr/produit/207/9782709915144/Lutte%20contre%20la%20maladie%20du%20sommeil%20et%20soins%20de%20sante%20primaire>
- Laveissière C, Grebaut P, Herder S, Penchenier L. 2000. *Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine*. Yaoundé, Cameroun: IRD.
- Laveissiere C, Grebaut P. 1990. Recherches sur les pièges à glossines (Diptera : Glossinidae). Mise au point d'un modèle économique : Le piège «Vavoua». *Trop Med Parasitol* 41:185–192.
- Leak SGA. 1999. Tsetse biology and ecology: Their role in the epidemiology and control of trypanosomosis. Nairobi, Kenya: ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Lindquist DA, Abusowa M, Hall MJ. 1992. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 6:2–8.
- Luckins AG. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol Today* 4:137–142.
- McInnis DO, Lance DR, Jackson CG. 1996. Behavioral Resistance to the Sterile Insect Technique by Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Annals of the Entomological Society of America* 89:739–744.

- Mellanby K. 1936. Humidity and Insect Metabolism. *Nature* 138:124–125.
- Meyer N, Simpson O. 1995. History of the Mexico and United States screwworm eradication programme. New York, NY, USA Vintage Press.
- Mihok S, Maramba O, Munyoki E, Kagoiya J. 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). *Trop Med Parasitol* 46:103–105.
- Minard G, Mavingui P, Moro CV. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors* 6:146.
- Mousson L, Martin E, Zouache K, Madec Y, Mavingui P, Failloux AB. 2010. *Wolbachia* modulates *Chikungunya* replication in *Aedes albopictus*. *Mol. Ecol.* 19:1953–1964.
- Mumba D, Bohorquez E, Messina J, Kande V, Taylor SM, Tshefu AK, Muwonga J, Kashamuka MM, Emch M, Tidwell R, et al. 2011. Prevalence of Human African Trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1246. [accessed 2015 Apr 21]
- Murray M, Trail JCM, Davis CE, Black SJ. 1984. Genetic Resistance to African Trypanosomiasis. *J Infect Dis* 149:311–319.
- Mutika GN, Kabore I, Parker AG, Vreysen MJB. 2014. Storage of male *Glossina palpalis gambiensis* pupae at low temperature: effect on emergence, mating and survival. *Parasit Vectors* 7:465.
- Mutika GN, Kabore I, Seck MT, Sall B, Bouyer J, Parker AG, Vreysen MJB. 2013. Mating performance of *Glossina palpalis gambiensis* strains from Burkina Faso, Mali, and Senegal. *Entomol Exp Appl* 146:177–185.
- Mutika GN, Opiyo E, Robinson AS. 2002. Effect of low temperature treatment on the quality of male adult *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae) in relation to the sterile insect technique (General Entomology). *Entomol Sci* 5:209–214.
- Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, Vien QM, Bui TC, Le HT, Kutcher S, et al. 2015. Field evaluation of the establishment potential of *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasites & Vectors* 8. [accessed 2015 Nov 15]. <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/563>
- Odiit M, Coleman PG, Liu W-C, McDermott JJ, Fevre EM, Welburn SC, Woolhouse MEJ. 2005. Quantifying the level of under-detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness cases. *Tropical Medicine & International Health* 10:840–849. [accessed 2015 Apr 21]
- Okello-Onen J, Heinonen R, Ssekitto CM, Mwayi WT, Kakaire D, Kabarema M. 1994. Control of tsetse flies in Uganda by dipping cattle in deltamethrin. *Trop Anim Health Prod* 26:21–27.
- Omolo MO, Hassanali A, Mpiana S, Esterhuizen J, Lindh J, Lehane MJ, Solano P, Rayaisse JB, Vale GA, Torr SJ, et al. 2009. Prospects for Developing Odour Baits To Control *Glossina fuscipes* spp., the Major Vector of Human African Trypanosomiasis. Aksoy S, editor. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e435.
- OMS. 1980. L'éradication mondiale de la variole: Rapport final de la Commission mondiale pour la certification de l'éradication de la variole. Genève: Organisation Mondiale de la Santé.

- O'Neill SL, Gooding RH, Aksoy S. 1993. Phylogenetically distant symbiotic microorganisms reside in *Glossina* midgut and ovary tissues. *Medical and Veterinary Entomology* 7:377–383. [accessed 2014 Feb 17]
- Opiyo E, Parker AG, Mohammed AH. 2006. Standard operating procedures of mass-rearing tsetse flies. Dyck VA, editor. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.
- Otieno LH, Kokwaro ED, Chintawi M, Onyango P. 1980. . Prevalence of enlarged salivary glands in wild populations of *Glossina pallidipes* in Kenya, with a note on the ultrastructure of the affected organ. *J Invertebr Pathol* 36:113–118.
- Pagabeleguem S, Seck MT, Sall B, Vreysen MJB, Gimonneau G, Fall AG, Bassene M, Sidibé I, Rayaisse J-B, Belem AMG, et al. 2015. Long distance transport of irradiated male *Glossina palpalis gambiensis* pupae and its impact on sterile male yield. *Parasit Vectors* 8:259.
- Pagabeleguem S. 2012a. Etude de compétitivité des mâles stériles dans le cadre de l'utilisation de la technique de l'insecte stérile pour l'éradication des glossines dans la zone des Niayes au Sénégal. France - Bénin: Université de Montpellier II - Université d'Abomey Calavi.
- Pagabeleguem S, Sangaré M, Bengaly Z, Akoudjin M, Belem AMG, Bouyer J. 2012b. Climate, Cattle Rearing Systems and African Animal Trypanosomosis Risk in Burkina Faso. *PLoS One* 7:e49762.
- Pais R, Lohs C, Wu Y, Wang J, Aksoy S. 2008. The Obligate Mutualist *Wigglesworthia glossinidia* Influences Reproduction, Digestion, and Immunity Processes of Its Host, the Tsetse Fly. *App Environ Microbiol* 74:5965–5974.
- Parker AG. 2005. Mass-Rearing for Sterile Insect Release. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile Insect Technique*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. p. 209–232. [accessed 2014 Oct 28]. http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4051-2_8
- Politzar H, Cuisance D. 1984a. An integrated campaign against riverine tsetse flies *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Sci Applic* 5:439–442.
- Politzar H, Merot P. 1984b. Attraction of the tsetse fly *Glossina morsitans submorsitans* to acetone, 1-octen-3-ol, and the combination of these compounds in West Africa. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 37:468–473.
- Pollock JN. 1982a. Manuel de lutte contre la mouche tsé-tsé: Biologie, systématique et répartition des tsé-tsé. Rome, Italy: FAO.
- Pollock JN. 1982b. Manuel de lutte contre la mouche tsé-tsé: Ecologie et comportement des tsé-tsé. Rome, Italy: FAO.
- Rayaisse JB. 2011a. Development of tools to control *Palpalis* group tsetse flies in West Africa [Docteur ès Sciences]. [Suisse]: Université de Neuchâtel.
- Rayaisse JB, Esterhuizen J, Tirados I, Kaba D, Salou E, Diarrassouba A, Vale GA, Lehane MJ, Torr SJ, Solano P. 2011b. Towards an Optimal Design of Target for Tsetse Control: Comparisons of Novel Targets for the Control of *Palpalis* Group Tsetse in West Africa. Masiga DK, editor. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1332.
- Rayaisse JB, Tirados I, Kaba D, Dewhurst SY, Logan JG, Diarrassouba A, Salou E, Omolo MO, Solano P, Lehane MJ, et al. 2010. Prospects for the Development of Odour Baits to Control the Tsetse Flies *Glossina tachinoides* and *G. palpalis* s.l. Ndung'u JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e632.

- Sang RC, Jura WG, Otieno LH, Mwangi RW. 1998. The Effects of a DNA Virus Infection on the Reproductive Potential of Female Tsetse Flies, *Glossina morsitans centralis* and *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:861–864.
- Saridaki A, Bourtzis K. 2010. Wolbachia: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology* 13:67–72. [accessed 2014 Feb 20]
- Sassera D, Epis S, Pajoro M, Bandi C. 2013. Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathogens and Global Health* 107:285–292. [accessed 2014 Feb 3]
- Seck MT, Pagabeleguem S, Bassene M, Fall AG, Diouf TAR, Sall B, Vreysen MJB, Rayaissé J-B, Takac P, Sidibé I, et al. 2015. Quality of sterile male *Glossina palpalis gambiensis* tsetse after long distance transport as chilled, irradiated pupae. *PLoS Negl Trop Dis*:in press.
- Seck MT, Bouyer J, Sall B, Bengaly Z, Vreysen MJB. 2010. The prevalence of African animal trypanosomoses and tsetse presence in Western Senegal. *Parasite* 17:257–265.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W. 2008. The genetics and cell biology of Wolbachia-host interactions. *Annu. Rev. Genet.* 42:683–707.
- Shaw APM, Torr SJ, Waiswa C, Cecchi G, Wint GRW, Mattioli RC, Robinson TP. 2013. Estimating the costs of tsetse control options: An example for Uganda. *Prev Vet Med* 110:290–303.
- Shelly TE, Edu J, Nishimoto J. 2013. Chilling and flight ability and mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly. *J Appl Entomol* 137:11–18.
- Shereni W. 1990. Strategic and tactical developments in tsetse control in Zimbabwe (1981–1989). *Int J Trop Insect Sci* 11:399–409.
- Shifaw A, Asaye M, Biyazen H. 2015. Epidemiology of non tsetse transmitted trypanosomosis in cattle, in Amhara Regional State of Bahir Dar Zuria and Fogera District, Ethiopia. *Acad J Anim Dis* 4:01–9.
- Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG. 2011. The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. Aksoy S, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5:e1007. [accessed 2015 Apr 16]
- Simarro PP, Cecchi G, Paone M, Franco JR, Diarra A, Ruiz JA, Fèvre EM, Courtin F, Mattioli RC, Jannin JG. 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr* 9:57–75.
- Solano P, Kaba D, Ravel S, Dyer NA, Sall B, Vreysen MJB, Seck MT, Darbyshir H, Gardes L, Donnelly MJ, et al. 2010. Population Genetics as a Tool to Select Tsetse Control Strategies: Suppression or Eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e692.
- Solano P, Ravel S, Bouyer J, Camara M, Kagbadouno MS, Dyer N, Gardes L, Herault D, Donnelly MJ, De Meeûs T. 2009. The Population Structure of *Glossina palpalis gambiensis* from Island and Continental Locations in Coastal Guinea. Lehane MJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e392.
- Solano P, De La Rocque S, De Meeus T, Cuny G, Duvallet G, Cuisance D. 2000. Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis*

- gambiensis* collected in the agro-pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Insect Mol Biol* 9:433–439.
- Sow A. 2013a. Trypanosomosis risk factors and impact assessment of a tsetse and trypanosomosis eradication campaign in Burkina Faso [PhD in Veterinary Science]. [Belgium]: Ghent University.
- Sow A, Ganaba R, Percoma L, Sidibé I, Bengaly Z, Adam Y, Koné P, Sawadogo GJ, Van Den Abbeele J, Marcotty T, et al. 2013b. Baseline survey of animal trypanosomosis in the region of the Boucle du Mouhoun, Burkina Faso. *Res Vet Sci* 94:573–578.
- Sow A, Sidibe I, Bengaly Z, Bancé AZ, Sawadogo GJ, Solano P, Vreysen MJB, Lancelot R, Bouyer J. 2012. Irradiated Male Tsetse from a 40-Year-Old Colony Are Still Competitive in a Riparian Forest in Burkina Faso. Brooke B, editor. *PLoS One* 7:e37124.
- Takken V, Oladunmade MA, Dengwat L, Feldmann HU, Onah JA, Tenabe SO, Hamann HJ. 1986. The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bull Entomol Res* 76:275.
- Teixeira L, Ferreira Á, Ashburner M. 2008. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. Keller L, editor. *PLoS Biology* 6:e2. [accessed 2014 Feb 19]
- Thompson JW, Mitchell F a. OM, Rees RB, Shereni W, Schoenfeld AH, Wilson A. 1991. Studies on the efficacy of deltamethrin applied to cattle for the control of tsetse flies (*Glossina* spp.) in southern Africa. *Trop Anim Health Prod* 23:221–226.
- Trial JCM, Wissocq N, d'Ieteren GD. 1993. Field research on measurement and use trypanotolerance criteria to enhance trypanotolerant livestock productivity. 2. Recent results quantifying trypanotolerance indicators. In: Towards increased use of trypanotolerance : current research and future directive. Nairobi, Kenya: IRLAD. p. 29–32.
- Vale GA. 1982. The improvement of traps for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bull Entomol Res* 72:95–106.
- Vale GA. 1974. The responses of tsetse flies (Diptera, Glossinidae) to mobile and stationary baits. *Bull Entomol Res* 64:545–588.
- Van Den Abbeele J, Bourtzis K, Weiss B, Córdón-Rosales C, Miller W, Abd-alla AMM, Parker A. 2013. Enhancing tsetse fly refractoriness to trypanosome infection – A new IAEA coordinated research project. *Journal of Invertebrate Pathology* 112:S142–S147. [accessed 2014 Jan 20]
- Van den Bossche P, Munsimbwe L, Mubanga J, Jooste R, Lumamba D. 2004. A large-scale trial to evaluate the efficacy of a 1% pour-on formulation of cyfluthrin (Cylence, Bayer) in controlling bovine trypanosomosis in Eastern Zambia. *Trop Anim Health Prod* 36:33–43.
- Van den Bossche P, De Deken R, Geerts S. 2003. Trypanosomiasis in southern Africa; old challenges - new threats. *Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors (I.C.P.T.V)* 7:11–13.
- Van den Bossche P, Rocque S de L, Hendrickx G, Bouyer J. 2010. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitol* 26:236–243.

- Van der Vloedt AM, Taher M, Tenabe SO. 1978. Effect of gamma radiation on the tsetse fly, *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-desv.) (Diptera, glossinidae) with observations on the reproductive biology. *Int J Appl Radiat Isot* 29:713–716.
- Vargas-Terán M, Hursey BS, Cunningham EP. 1994. Eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitol Today* 10:119–122.
- Villasenor A, Carrillo J, Zavala J, Stewart J, Lira C, Reyes J. 2000. Current progress in the medfly program Mexico-Guatemala. In: Tan KH, editor. *Proceedings: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests. International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, and the 5th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 28 May–5 June 1998. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia. Penang, Malaysia.* p. 361–368.
- Vreysen MJB, Saleh KM, Mramba F, Parker AG, Feldmann U, Dyck VA, Msangi A, Bouyer J. 2014. Sterile insects to enhance agricultural development: the case of sustainable tsetse eradication on Unguja Island, Zanzibar, using an area-wide integrated pest management approach. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2857.
- Vreysen MJB, Balenghien T, Saleh KM, Maiga S, Koudougou Z, Cecchi G, Bouyer J. 2013a. Release-Recapture Studies Confirm Dispersal of *Glossina palpalis gambiensis* between River Basins in Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:e2022.
- Vreysen MJB, Seck MT, Sall B, Bouyer J. 2013b. Tsetse flies: their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *J Invertebr Pathol* 112:15–25.
- Vreysen MJB. 2005. Monitoring Sterile and Wild Insects in Area-Wide Integrated Pest Management Programmes. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile Insect Technique*. Vienna, Austria: Springer Netherlands. p. 325–361. [accessed 2015 Sep 22]. http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4051-2_12
- Vreysen MJB. 2001. Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Med Trop (Mars)* 61:397–411.
- Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu Z-R, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA, Feldmann U. 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *J Econ Entomol* 93:123–135.
- Vreysen MJB. 1995a. Radiation induced sterility to control tsetse flies: the effect of ionising radiation and hybridisation on tsetse biology and the use of the sterile insect technique in integrated tsetse control. [Wageningen UR]: Landbouwniversiteit.
- Vreysen MJB, Van Der Vloedt AMV. 1995b. Radiation sterilization of *Glossina tachinoides* Westw. pupae. I. The effect of dose fractionation and nitrogen during irradiation in the mid-pupal phase. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 48:45–51. [accessed 2015 Jan 3]
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, et al. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476:450–453.
- Wang J, Aksoy S. 2012. PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse's offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:10552–10557.

- Weiss BL, Maltz M, Aksoy S. 2012. Obligate Symbionts Activate Immune System Development in the Tsetse Fly. *J Immunol* 188:3395–3403.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6:741–751. [accessed 2014 Feb 20]
- WHO. 2015. Trypanosomiasis Human African (sleeping sickness). [accessed 2014 Feb 4]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>
- WHO. 2006. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 81:71–80.
- WHO. 1998a. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO technical report series 881. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 1998b. Global disease elimination and eradication as public health strategies: proceedings of a conference held in Atlanta, Georgia, USA, 23-25 February 1998. Bulletin of the World Health Organization. Goodman RA, Foster KL, Trowbridge FL, Figueroa JP, editors. Geneva: World Health Organization (Supplement no. 2 to volume 76, 1998, of the Bulletin of the World Health Organization).
- Wyss JH. 2000. Screwworm eradication in the Americas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916:186–193.
- Yamagishi M, Kakinohana H, Kuba H, Kohama T, Nakamoto Y, Sokei Y, Kinjo K. 1993. Eradication of the melon fly from Okinawa, Japan, by means of the sterile insect technique. In: *Proceedings: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. FAO/IAEA International Symposium, 19–23 October 1992. STI/PUB/909. IAEA. Vienna, Austria: IAEA. p. 49–60.